

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

EFFET DE LA SALINITÉ ET DE L'EDTA SUR LA TOXICITÉ DES
NANOPARTICULES DE MAGNÉTITE ET D'OXYDE DE CUIVRE CHEZ
ARTEMIA SALINA, *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* ET *CHLAMYDOMONAS*
EURYALE

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR
ÉMILIE CANUEL

JANVIER 2017

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.07-2011). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Mes études de maîtrise en chimie ont été une expérience formidable et enrichissante pour moi. Je tiens à remercier mon directeur de recherche le Pr David Dewez pour son soutien, sa disponibilité et sa bonne humeur. J'ai beaucoup appris avec lui sur la toxicologie de l'environnement et la biochimie des algues.

Je remercie le Dr Cleiton Vaz qui m'a initié aux bioessais avec les artémies, Mahshid Samadani et Marie-Claude Perron qui m'ont énormément aidé et conseillé dans mes expériences avec les algues. Je veux remercier Hermine Betis qui m'a assisté dans la caractérisation des nanoparticules. J'ai adoré travailler avec elle. Je remercie également le Dr Abdallah Oukarroum qui me conseillait toujours avec une grande gentillesse.

J'ai reçu beaucoup de soutien technique lors de mes expériences; un grand merci à Gwenaël Chamoulaud et Volodymyr Kriuchkov de l'équipe NanoQam et Denis Flipo du TOXEN.

Je veux également remercier tous ceux que j'ai côtoyés au cours des trois dernières années qui contribuaient à rendre mon quotidien joyeux et agréable. J'ai une pensée toute spéciale pour le personnel du magasin de chimie; Luc, Chantale et Sophie.

Finalement, je veux remercier ma famille qui m'a soutenue tout au long de mon parcours académique. Cette réussite est aussi la leur.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES ÉQUATIONS	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xi
LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS	xii
RÉSUMÉ	xiv
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
CHAPITRE I	
LES PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DES NANOPARTICULES	
MÉTALLIQUES EN MILIEU AQUEUX.....	
1.1 La théorie DLVO; le potentiel Zêta et la taille hydrodynamique	4
1.2 L'effet des paramètres du milieu; pH, lumière et température	6
1.3 La salinité.....	8
1.4 La présence de ligands: la chimie et la toxicité de l'EDTA.....	8
CHAPITRE II	
LES NANOPARTICULES ÉTUDIÉES.....	
2.1 Les nanoparticules de magnétite, Fe_3O_4	12
2.1.1 Utilisation.....	12
2.1.2 Toxicité	13
2.2 Les nanoparticules d'oxyde de cuivre, CuO	15
2.2.1 Utilisation.....	15
2.2.2 Toxicité	15

CHAPITRE III	
LES BIOESSAIS	18
3.1 Artémies <i>nauplii</i>	18
3.2 Algues vertes	23
CHAPITRE IV	
MATÉRIEL ET MÉTHODES	25
4.1 La caractérisation des nanoparticules.....	25
4.1.1 Le diamètre hydrodynamique	25
4.1.2 Le potentiel Zêta	28
4.1.3 La solubilité (Spectroscopie d'absorption atomique/ spectroscopie d'émission atomique).....	29
4.2 Les cultures d'algues.....	31
4.3 La cinétique rapide de la fluorescence chlorophyllienne.....	33
4.4 La viabilité cellulaire	35
CHAPITRE V	
EFFET DE L'EDTA ET DE LA SALINITÉ SUR LES PROPRIÉTÉS DES NANOPARTICULES DE MAGNÉTITE ET D'OXYDE DE CUIVRE EN MILIEU AQUEUX.....	38
5.1 Résumé.....	39
5.2 Matériel et méthodes	42
5.2.1 Matériel biologique	42
5.2.2 Calcul de la force ionique des milieux.....	43
5.2.3 Caractérisation physico-chimique des nanoparticules	43
5.2.4 Exposition aux contaminants	44
5.2.5 Bioessais sur les artémies <i>nauplii</i>	44
5.2.6 Bioessais sur les algues vertes	45
5.2.6.1 Inhibition de la croissance.....	45
5.2.6.2 Cinétique rapide de la fluorescence chlorophyllienne	46

5.2.6.3 Viabilité cellulaire	46
5.2.7 Analyses statistiques	47
5.3 Résultats et discussion.....	47
5.3.1 Caractérisation physico-chimique des nanoparticules	47
5.3.2 Bioessais de toxicité.....	50
5.4 Conclusion.....	52
5.5 Remerciements.....	53
CONCLUSION.....	66
BIBLIOGRAPHIE	68

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Agglomération des NPs en milieu aqueux (modifié à partir de Jiang <i>et al.</i> , 2009)	5
Figure 1.2. Effet du pH sur le potentiel Zêta et le diamètre hydrodynamique des TiO ₂ -NPs (Jiang <i>et al.</i> , 2009).	6
Figure 1.3. Effet de la force ionique sur le potentiel Zêta et le diamètre hydrodynamique des TiO ₂ -NPs (Jiang <i>et al.</i> , 2009).	8
Figure 1.4. Structure de l'éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) (reproduite à l'aide du logiciel ACD/ChemSketch).	9
Figure 1.5. Structure d'un complexe d'EDTA avec un métal (M) (reproduite à l'aide du logiciel ACD/ChemSketch).	10
Figure 3.1. Distribution d'artémies dans le monde (Vanhaecke <i>et al.</i> , 1987).	18
Figure 3.2. Cycle de vie des artémies (fishkeepingadvice.com).	20
Figure 3.3. Influence de la température sur l'éclosion des artémies (Sorgeloos <i>et al.</i> , 1978).	21
Figure 3.4. Sensibilité des différents instars à l'acide chromique (Sorgeloos <i>et al.</i> , 1978).	22
Figure 3.5. Morphologie d'une cellule de Chlamydomonas ; F, flagelle; BB, corpuscule basal ; Chl, chloroplastes; Cv, vacuole contractée; Cw, paroi cellulaire; Er, réticulum endoplasmique; Es, stigma; G, appareil de Golgi; L, lipide; Mi, mitochondrie; N, noyau; No, nucléole; P, pyrénioïde; R, ribosome; S, amidon; V, vacuole. (Harris, 2001).....	24
Figure 4.1. Illustration de la relation entre la taille et la vitesse de déplacement d'une particule (Malvern Instruments Ltd., 2004).	26
Figure 4.2. Les trois types de présentation de distributions de taille (Malvern Instruments Ltd., 2004).	27

Figure 4.3. Double couche électrique d'une particule dans un liquide (Malvern Instruments Ltd., 2004).	28
Figure 4.4. Spectrométrie d'absorption, d'émission et de fluorescence dans une flamme (modifié de Harris, 2010).	30
Figure 4.5. Courbes d'étalonnage des cultures de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (A) et <i>Chlamydomonas euryale</i> (B) et courbes de croissance (C) dans le milieu HSM et HSM modifié aux salinités de 10 et 32g/L.	32
Figure 4.6. Étapes du transfert d'électrons (modifié de Cornic, 2007).	33
Figure 4.7. Cinétique rapide de la fluorescence (élaboré de Strasser <i>et al.</i> , 2004).	34
Figure 4.8. Représentation schématique de la cytométrie en flux (modifié de Arsenault <i>et al.</i> , 1993).	36
Figure 4.9. Structure de l'iodure de propidium (IP) (reproduite à partir de https://www.thermofisher.com à l'aide du logiciel ACD/ChemSketch).	37
Figure 4.10. Spectre de fluorescence de l'iodure de propidium (excitation [bleu] et émission [rouge]) (reproduit de https://www.thermofisher.com).	37
Figure 5.1. Potentiel Zêta des Fe ₃ O ₄ -NPs à 50mg/L (A) et 100mg/L (B) et des CuO-NPs à 50mg/L (C) et 100mg/L (D) dans le milieu Instant Ocean selon la salinité (0, 10 et 32g/L) en présence d'EDTA (0, 10 et 100mg/L) à un pH de 8,1.	54
Figure 5.2. Potentiel Zêta des Fe ₃ O ₄ -NPs à 50mg/L (A) et 100mg/L (B) et des CuO-NPs à 50mg/L (C) et 100mg/L (D) exposé à l'EDTA (0, 10 et 100mg/L) dans le milieu HSM pour différentes salinités (0, 10 et 32g/L).	55
Figure 5.3. Diamètre hydrodynamique des Fe ₃ O ₄ -NPs à 50mg/L(A) et 100mg/L(B) et des CuO-NPs à 50mg/L(C) et 100mg/L(D) dans le milieu Instant Ocean pour différentes salinités (0, 10 et 32g/L).	56
Figure 5.4. Diamètre hydrodynamique des Fe ₃ O ₄ -NPs à 50mg/L(A) et 100mg/L(B) et des CuO-NPs à 50mg/L(C) et 100mg/L(D) dans le milieu HSM pour différentes salinités (0, 10 et 32g/L).	57
Figure 5.5. Solubilité des CuO-NPs exposées à l'EDTA (0, 10 et 100mg/L) dans le milieu Instant Ocean (A) et HSM (B) pour différentes salinités (0, 10 et 32g/L).	58
Figure 5.6. Effet léthal des nanoparticules de Fe ₃ O ₄ et de CuO sur les artémies <i>nauplii</i> selon la concentration d'EDTA (0, 10 et 100mg/L) à une salinité de 10g/L (A)	

et 32g/L (B). Le témoin représente un milieu exempt de NPs et d'EDTA. * représente un résultat significativement différent du témoin ($p < 0,05$). 59

Figure 5.7. Bioaccumulation des NPs chez *Artemia* sp. après 48h d'exposition. Les photos des artémie *nauplii* ont été prises au microscope optique; Artémie témoin (A), artémie contaminée aux CuO-NPs (B), artémie contaminée aux Fe₃O₄-NPs (C) à des concentrations de 50mg/L. 60

Figure 5.8. Viabilité cellulaire de *C. reinhardtii* dans le milieu HSM (A) et de *C. euryale* à une salinité de 10g/L (B) et 32g/L (C) selon le temps d'exposition et la concentration d'EDTA (0, 10, 100mg/L). * représente un résultat significativement différent du témoin ($p < 0,05$). 61

Figure 5.9. Inhibition de la division cellulaire sur 72h de *C. reinhardtii* dans le milieu HSM (A) et de *C. euryale* dans le milieu HSM à une salinité de 10g/L (B) et 32g/L (C). * représente un résultat significativement différent du témoin ($p < 0,05$). 62

Figure 5.10. Indice de la performance de l'activité photosynthétique pour *C. reinhardtii* dans le milieu HSM (A) et de *C. euryale* dans le milieu HSM à une salinité de 10g/L (B) et 32g/L (C) selon le temps d'exposition. * représente un résultat significativement différent du témoin ($p < 0,05$). 63

Figure 5.11. Indice de la performance de l'activité photosynthétique pour *C. reinhardtii* dans le milieu HSM (A) et de *C. euryale* dans le milieu HSM à une salinité de 10g/L (B) et 32g/L (C) selon le temps d'exposition en présence de 10mg/L d'EDTA. 64

Figure 5.12. Indice de la performance de l'activité photosynthétique pour *C. reinhardtii* dans le milieu HSM (A) et de *C. euryale* dans le milieu HSM à une salinité de 10g/L (B) et 32g/L (C) selon le temps d'exposition en présence de 100mg/L d'EDTA. 65

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 4.1. Définition des paramètres de la cinétique rapide de fluorescence chlorophyllienne (Strasser <i>et al.</i> , 2004).	35
---	----

LISTE DES ÉQUATIONS

Équation 4.1. Équation de Stokes-Einstein.....	25
Équation 4.2. Équation de Henry	29
Équation 5.1. Taux relatif de division cellulaire (RCDR)	46
Équation 5.2. Indice de performance du PSII	46

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
ATP	Adénosine triphosphate
<i>Chl_a</i>	Chlorophylle <i>a</i>
CNT	Nanotube de carbone
CuO-NPs	Nanoparticules de cuivre
EC50	Concentration à laquelle un effet est observé sur 50% de la population
Fe ₃ O ₄ -NPs	Nanoparticules de magnétite
EDTA	Éthylène Diamine Tétra-acétique
ENP	Nanoparticule d'ingénierie
HSM	« <i>High salt growth medium</i> »
ICP-EOS	Inductively coupled plasma – optical emission spectrometry
IP	Iodure de propidium
LC50	Concentration létale pour 50% de la population
NPs	Nanoparticules
P680	Groupe de chlorophylles <i>a</i> faisant partie du PSII
P*680	P680 excité
PHEO	Phéophytine
P.I.	Indice de performance de PSII
pK _c	Log de la constante de dissociation d'un complexe
PSII	Photosystème II
RCDR	Taux relatif de division cellulaire (relative cell division rate)
SFRA	Acide fluviq de la rivière Suwannee
siARN	Short-interfering ARN
TYR	Tyrosine

LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

ϵ	Constante diélectrique
D	Coefficient de diffusion
$F_{2\text{ms}}$	Intensité de fluorescence à 2 ms
$F_{300\mu\text{s}}$	Intensité de fluorescence à 300 μs
F_0	Intensité de fluorescence de base déterminée à 20 μs
F_m	Intensité de fluorescence maximale induite par un flash saturant
F_v	Intensité de fluorescence variable déterminée à 2 ms
$f(\kappa a)$	Fonction de Henry
k_B	Constante de Boltzmann
η	Viscosité du medium
M_O	Taux de fermeture des centres réactionnels
Q_A	Quinone
Q_B	Plastoquinone
R	Rayon de la particule
T	Température absolue
U_E	Mobilité électrophoretique
V_J	Fluorescence variable à la transition J
W_0	Densité cellulaire au temps initial
$W_{72\text{h}}$	Densité cellulaire après 3 jours
ζ	Potentiel Zêta
g	Gramme
kg	Kilogramme
mg	Miligramme
μg	Microgramme

L	Litre
h	Heure
m	Mètre
mm	Milimètre
nm	Nanomètre

RÉSUMÉ

Les nanomatériaux étant de plus en plus répandus dans les produits ménagers, la possibilité de rejets de nanorésidus dans l'environnement devient problématique. Le présent projet vise à investiguer le comportement des nanoparticules métalliques dans le milieu marin et en eau douce afin de déterminer l'impact de la salinité et de la présence d'un ligand organique. Pour ce faire, les caractéristiques physico-chimiques et toxicologiques des nanoparticules de magnétite et d'oxyde de cuivre ont été évaluées sur *Artemia sp.*, *Chlamydomonas reinhardtii* et *Chlamydomonas euryale*. Pour *Artemia sp.*, les nanoparticules de magnétite n'ont pas d'effet toxique dans les conditions testées tandis que les nanoparticules d'oxyde de cuivre ont un effet létal significatif. Cet effet diminue avec l'augmentation de la salinité et la présence de l'EDTA. Toutefois, il a été remarqué que les deux nanoparticules peuvent se bioaccumuler dans les intestins des artémies. Chez les algues vertes, les nanoparticules d'oxyde de cuivre ont tendance à diminuer la viabilité cellulaire de *C. reinhardtii* de façon non significative. L'EDTA produit un effet de carence sur *C. reinhardtii* en entraînant une mortalité de 100% à l'intérieur de 48h pour une concentration de 100 mg/L. Également, l'EDTA diminue le taux de division cellulaire et l'indice de performance de la photosynthèse. Toutefois, la présence des nanoparticules a un effet stimulant sur ces deux paramètres. La solubilité des nanoparticules d'oxyde de cuivre augmente considérablement avec la présence de l'EDTA sans toutefois augmenter leur toxicité. L'augmentation de la salinité diminue l'effet toxique des nanoparticules et de l'EDTA sur *Artemia sp.*, *C. reinhardtii* et *C. euryale*. Ce phénomène peut être expliqué par l'augmentation de la taille des agglomérats avec la salinité et une plus grande présence d'ions dans le milieu qui peuvent empêcher l'EDTA de chélater d'autres métaux. En conclusion, ce projet permet de constater que les paramètres du milieu ont un impact significatif sur les propriétés physico-chimiques des nanoparticules de magnétite et d'oxyde de cuivre qui elles-mêmes influencent considérablement leur toxicité.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Aussi appelée la nano-écotoxicologie, l'écotoxicologie des nanomatériaux s'intéresse à l'effet des nanoparticules et des nanomatériaux sur l'environnement. Cette sous-discipline s'intéresse particulièrement aux propriétés qui les distinguent des contaminants non nanométriques et influencent leur toxicité comme la taille, la forme, la chimie et l'aire de surface.

Par définition, les nanoparticules sont des particules ayant entre 1 et 100 nm de diamètre. On peut les classer en deux catégories; les nanoparticules d'ingénierie qui sont synthétisées par l'homme, et les nanoparticules qui sont d'origine naturelle. On compte de nombreux exemples de nanoparticules qui sont naturellement présentes dans l'environnement: la poussière et la cendre volcanique, la fumée des feux de forêt, les fragments de pollen, les virus, etc. (Handy *et al.*, 2008). Les nanoparticules naturelles se retrouvent sous des formes hétérogènes et polydispersées tandis que les nanoparticules d'ingénierie sont le plus souvent homogènes et monodispersées (Navarro *et al.*, 2008).

Le comportement des nanoparticules en milieux aqueux dépend de leurs propriétés physico-chimiques comme la forme, la taille, l'aire de surface et la charge de surface. Dans l'environnement, les nanoparticules sont susceptibles de s'agglomérer et/ou de se lier ou de s'adsorber à la matière organique ou inorganique. Les agglomérations ou les complexes qui sont formés vont modifier les interactions des nanoparticules avec le milieu et donc leur toxicité (Matranga et Corsi, 2012; Powers *et al.*, 2007). L'utilisation de ligands tels que le citrate, la cystéine, des carbonates ou des surfactants comme le lauryl sulfate pour enrober (*coating*) les nanoparticules d'ingénierie (ENP) est courante. L'enrobage sert à les fonctionnaliser et à assurer leur

stabilité (Navarro *et al.*, 2008). Toutefois, il peut autant diminuer qu'augmenter la toxicité des nanoparticules.

L'industrie des nanoparticules a connu un grand essor au cours des dernières décennies (Vance *et al.*, 2015). Les applications de ces technologies sont nombreuses et elles se diversifient encore. Les nanoparticules métalliques font partie des constituants d'un grand nombre de produits ménagers. On les retrouve dans différents domaines comme les produits de soins personnels, les peintures, les produits anti-salissures, les dispositifs électroniques, le textile, les soins biomédicaux, les énergies renouvelables et les méthodes d'assainissement de l'environnement (Matranga et Corsi, 2012; Weir *et al.*, 2012; Sanchez *et al.*, 2011).

Les nanoparticules peuvent être relâchées dans l'environnement lors de leur fabrication, de leur utilisation ou de leur dégradation (Gottschalk et Nowack, 2011). Mueller et Nowack (2008) estiment selon leur modèle de cycle de vie des NPs que les concentrations de Ag-NP, TiO₂-NP, et de nanotubes de carbone (CNT) seraient de 1,7; 1,5 et 1,5 ng/m³ dans l'air; 0,03; 0,7 et 0,0005 µg/L dans l'eau et 0,02; 0,4 et 0,01 µg/kg dans le sol. Cependant, d'après ces études précédentes, les effets des nanoparticules sur les écosystèmes ne sont pas encore tout à fait connus et leur étude est nécessaire pour pouvoir les comprendre et les prévoir.

Ce projet a pour objectif principal de déterminer la relation entre les propriétés physico-chimiques et la toxicité de deux nanoparticules (NPs); la magnétite (Fe₃O₄-NPs) et l'oxyde de cuivre (CuO-NPs). Pour ce faire, l'effet de deux paramètres du milieu: -la salinité et la présence d'un ligand (l'EDTA)- sur les propriétés physico-chimiques des deux NPs seront étudiées. Par la suite, l'effet de la salinité et de l'EDTA sur la toxicité des NPs sera déterminé. Il est attendu que les paramètres favorisant une meilleure solubilité des nanoparticules et une diminution de la taille des agglomérats rendraient les nanoparticules plus biodisponibles et augmenterait

ainsi l'effet toxique observé lors de bioessais. L'EDTA, en se liant aux nanoparticules, devrait les rendre moins biodisponibles. Pour réaliser ce projet, les NPs choisies seront caractérisées selon le diamètre hydrodynamique, le potentiel Zêta et leur solubilité dans différents milieux de culture. Puis, leur toxicité sera évaluée sur le crustacé *Artemia sp.* et les algues vertes *Chlamydomonas reinhardtii* et *Chlamydomonas euryale* à différentes salinités et concentration d'EDTA.

Ce mémoire est constitué de cinq chapitres. Le premier chapitre décrit la façon dont les paramètres environnementaux peuvent influencer les propriétés physico-chimiques des nanoparticules. Les deux nanoparticules qui ont été étudiées sont présentées dans le deuxième chapitre. Ensuite, le troisième chapitre discute plus en détail des organismes modèles qui ont été utilisés pour réaliser les bioessais. L'avant-dernier chapitre explique les méthodes expérimentales qui ont été employées. Finalement, les résultats du projet sont présentés dans le dernier chapitre sous forme d'un article.

CHAPITRE I : LES PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DES NANOPARTICULES MÉTALLIQUES EN MILIEU AQUEUX

1.1 La théorie DLVO; le potentiel Zêta et la taille hydrodynamique

La théorie DLVO a été développée par les chimistes et physiciens Boris Derjaguin, Lev Landau, Evert Verwey et Theodoor Overbeek (Derjaguin et Landau, 1941; Verwey et Overbeek, 1948). Cette théorie explique le phénomène d'agglomération et la stabilité de particules dispersées par le résultat de deux forces; les forces d'attraction et les forces de répulsion. Les forces d'attraction se résument aux forces de Van der Waals. Les forces de répulsions dites électrostatiques sont produites par la double couche électrique. Celle-ci est caractérisée par le potentiel Zêta qui représente la charge formée par les ions présents à la surface de la nanoparticule lorsqu'elle se trouve dans un milieu aqueux. Il existe également une force de répulsion stérique qui peut entrer en jeu lorsque les nanoparticules sont enrobées par un polymère ou un ligand encombrant (Hoshino *et al.*, 2004).

L'équilibre entre les forces d'attraction et de répulsion est fortement influencé par les paramètres du milieu (Murdoch *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2009). Par exemple, une augmentation de la force ionique diminue l'épaisseur de la double couche électrique. Ainsi, les forces d'attraction deviennent dominantes et les nanoparticules ont tendance à former des agglomérats plus importants (fig. 1.1) (Verwey et Overbeek, 1948). On peut aussi parler d'une augmentation du diamètre hydrodynamique.

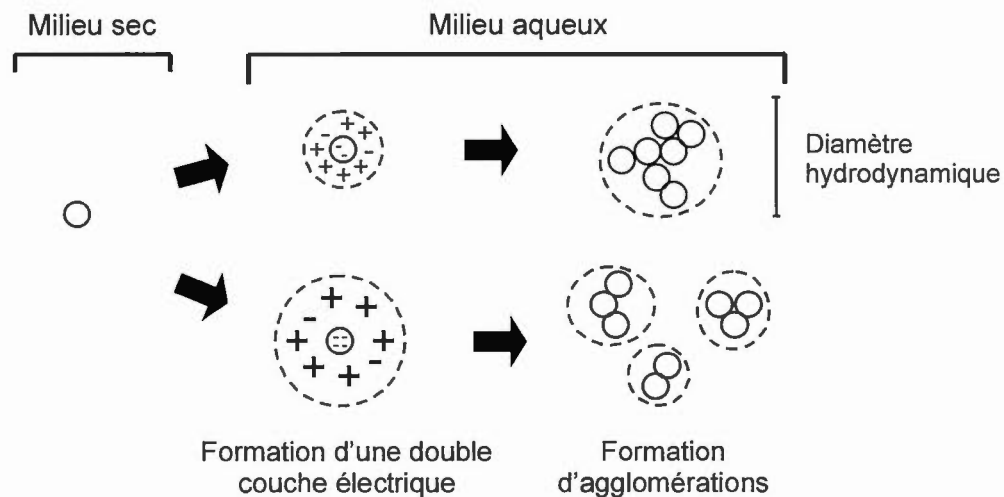


Figure 1.1. Agglomération des NPs en milieu aqueux (modifié à partir de Jiang *et al.*, 2009)

Le pH quant à lui peut jouer sur la charge de surface par des processus d'ionisation ou d'adsorption d'ions. Pour les oxydes minéraux et les sulfures, un bas pH favorise une charge de surface positive tandis qu'un pH élevé crée une charge de surface négative (Kosmulski, 2002; Jiang *et al.*, 2009). Une charge de surface élevée augmente les forces de répulsion électrostatique entre les particules. Ainsi, les agglomérats formés sont de taille moins importante. Chaque composé possède un point isoélectrique qui représente le pH pour lequel la charge de surface nette est nulle (fig. 1.2) (Parks, 1964).

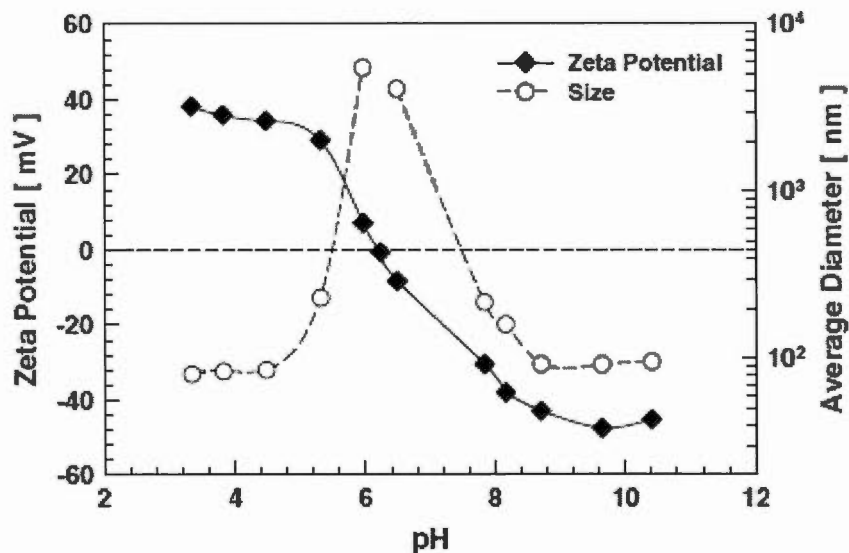


Figure 1.2. Effet du pH sur le potentiel Zêta et le diamètre hydrodynamique des TiO_2 -NPs (Jiang *et al.*, 2009).

Finalement, l'augmentation de la concentration de nanoparticules dans la solution fait en sorte que les collisions entre les particules sont plus fréquentes. Ainsi, les agglomérats se forment plus rapidement. La diminution de la taille des nanoparticules a aussi cet effet, car le potentiel interatomique diminue avec la taille (He *et al.*, 2008).

1.2 L'effet des paramètres du milieu; pH, lumière et température

Le comportement des nanoparticules métalliques est dicté par les paramètres du milieu. Le pH, par exemple, affecte le potentiel Zêta, mais aussi la dissolution des métaux dans le milieu. Il est connu qu'un métal se solubilise davantage à bas pH (Ko et Lee, 2010; Schwertmann, 1991). Cela est aussi vrai pour les nanoparticules de métal et les nanoparticules d'oxydes de métal comme les CuO -NPs, les ZnO -NPs et les TiO_2 -NPs (Avramescu *et al.*, 2016; Odzak *et al.*, 2014). De plus, Meißner *et al.* (2014) ont observé la diminution du potentiel Zêta des ZnO -NPs et du pH dans le temps avec la libération des ions de zinc. Les ions libérés par la dissolution du métal

entraînent la diminution du potentiel Zêta en interagissant avec la double couche électrique.

Dans certains cas, la lumière peut donner assez d'énergie cinétique aux nanoparticules d'oxydes métalliques pour défaire les agglomérations (Zhou *et al.*, 2012). Shi *et al.* (2013) ont démontré que la lumière a un effet sur les nanoparticules d'argent. À une intensité de 12000 lx, les nanoparticules irradiées libèrent une grande quantité d'ions d'argent. Ces ions font diminuer la valeur absolue du potentiel Zêta en détruisant une partie de la double couche électrique. Ensuite, la concentration en ions d'argent dans la solution tend à diminuer, car ils sont absorbés par les nanoparticules et réduits. Au final, la libération d'ions par les nanoparticules était moins importante lorsqu'elles étaient en présence de lumière et la formation d'agglomérats était favorisée.

Ensuite, Zhou *et al.* (2012) ont montré que la température fait diminuer la taille des agglomérats des nanoparticules d'oxydes métalliques lorsqu'elle augmente (de 25 °C à 65 °C), mais qu'elle fait augmenter leur taille lorsqu'elle redescend (de 65 °C à 25 °C). À la fin de cette expérience, les agglomérats étaient plus importants qu'au début. De la même façon, le potentiel Zêta semblerait diminuer avec l'augmentation de la température et augmenter avec sa diminution (Akratopulu *et al.*, 1990). Cependant, la diminution du potentiel Zêta ne favorise pas la dispersion. Cette dernière est plutôt expliquée par le fait que l'énergie cinétique fournie par la température est assez forte pour perturber les forces d'attraction qui retiennent les particules ensemble. Lorsque la température diminue, les forces d'attraction reprennent le dessus (Zhou *et al.*, 2012).

1.3 La salinité

Selon la théorie DLVO, le premier effet de la salinité sur les nanoparticules est de diminuer l'épaisseur de la double couche électrique et de créer des agglomérats (fig. 1.3) (Jiang *et al.*, 2009; Pavlin et Bregar, 2012; Brant *et al.*, 2005).

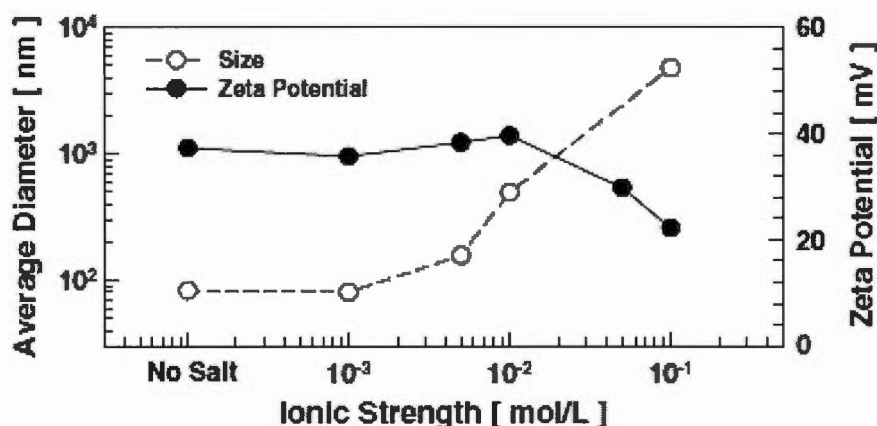


Figure 1.3. Effet de la force ionique sur le potentiel Zêta et le diamètre hydrodynamique des TiO₂-NPs (Jiang *et al.*, 2009).

Ceci fait en sorte que la sédimentation se fera plus rapidement à haute salinité (Keller *et al.*, 2010). De plus, la salinité aurait tendance à augmenter la solubilité des CuO-NPs. Toutefois, la toxicité des nanoparticules diminue avec l'augmentation de la salinité chez les poissons en raison de la compétition entre les cations et les ions de cuivre pour les sites actifs (Ates *et al.*, 2014).

1.4 La présence de ligands: la chimie et la toxicité de l'EDTA

Les ligands organiques sont présents naturellement dans l'environnement. Leur impact sur le comportement des nanoparticules dépend de leurs propriétés chimiques. De façon générale, il semblerait que les ligands organiques s'adsorbent à la surface des nanoparticules et change leurs propriétés physico-chimiques. Dans la plupart des cas, le potentiel Zêta diminue à des valeurs très négatives avec l'augmentation de la

concentration du ligand. Cette diminution entraîne la stabilisation des nanoparticules dans le milieu aqueux (Mohd *et al.*, 2014; Miao *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015). La salinité peut annuler l'effet de cette stabilisation en augmentant la force ionique du milieu. Dans ce cas, les forces d'attraction deviennent dominantes et la taille des agglomérats augmente (Wang *et al.*, 2014). Les ligands peuvent avoir un impact sur la toxicité des NPs métalliques. Par exemple, l'éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) (fig. 1.4) et l'acide fluvique diminuent la toxicité du cuivre sur l'algue *Scenedesmus subspicatus* en complexant les ions, car les complexes formés sont non biodisponibles. Le cuivre ne peut donc être absorbé ou adsorbé sur les parois cellulaires (Ma *et al.*, 2003). Le cas inverse est aussi possible. Dans l'article de Wang *et al.* (2011), l'acide fluvique de la rivière Suwannee (SRFA) augmente la toxicité des CuO-NPs chez la cyanobactérie *Microcystis aeruginosa* en favorisant la dissolution du cuivre, mais aussi en rendant les ions biodisponibles aux parois cellulaires.

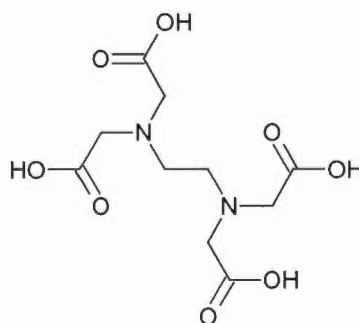


Figure 1.4. Structure de l'éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) (reproduite à l'aide du logiciel ACD/ChemSketch).

L'EDTA est un acide aminopolycarboxylique qui est utilisé dans les détergents, le traitement des eaux, l'industrie de pâte et papier et comme préservatif dans les produits alimentaires (Oviedo et Rodríguez, 2003; Brul et Coote, 1999). Étant un puissant chélateur, l'EDTA permet d'amplifier jusqu'à 100 fois l'accumulation des métaux lors de la phytoextraction (Evangelou *et al.*, 2007). En solution, l'équilibre entre le métal lié à un ligand et le métal libre est déterminé par la concentration des

autres métaux présents dans le milieu ainsi que la constante de stabilité de complexe. La formation du complexe favorise la dissolution du métal. L'EDTA forme des complexes stables dont la dégradation en solution dépend des paramètres du milieu et du métal chélaté (Nowack, 2002). La géométrie de ces complexes est généralement de forme octaédrique (fig. 1.5) (Kočanová *et al.* 2010; Liu *et al.* 2011; Meier *et al.* 2002) :

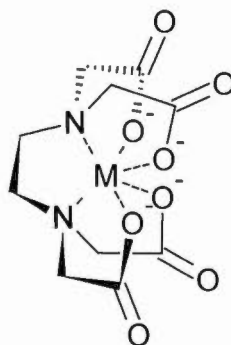


Figure 1.5. Structure d'un complexe d'EDTA avec un métal (M) (reproduite à l'aide du logiciel ACD/ChemSketch).

Dans les milieux de culture d'algue, l'EDTA est souvent utilisé en faible concentration pour solubiliser les métaux essentiels comme le fer qui précipiterait autrement (Hamm, 1996). En plus forte concentration, les métaux traces peuvent être complètement liés à l'EDTA et devenir non biodisponibles pour l'organisme causant un effet toxique. L'EDTA inhibe la croissance des algues *Scenedesmus quadricauda* et *Scenedesmus subspicatus* à des concentrations de l'ordre du mg/L (Bringmann et Kühn, 1980; European Chemicals Bureau 2004). Dans l'environnement, ce phénomène serait moins probable, car les éléments nutritifs excèdent de beaucoup la concentration d'EDTA (European Chemicals Bureau 2004). La présence de l'EDTA pourrait toutefois engendrer une efflorescence algale à la fois en améliorant la disponibilité des métaux traces essentiels et en réduisant la biodisponibilité des métaux toxiques (Schmidt et Brauch, 2004). Il a été démontré expérimentalement sur le poisson *Lepomis macrochirus* que l'EDTA est peu susceptible de se bioaccumuler

dans l'organisme, car il s'agit d'une molécule très polaire (European Chemicals Bureau 2004).

L'EDTA provoque l'inhibition de la croissance chez l'algue *Desmodesmus subspicatus* avec une EC50 de 67mg/L, l'immobilisation de *Daphnia magna* (EC50 113mg/L) et leur mortalité à 3g/L ainsi que la mort d'*Artemia salina* avec une LC50 de 623,61mg/L (Straub *et al.*, 2012; Moyo et Tandlich, 2014; Arruda *et al.*, 2011). Il a été démontré par Arruda *et al.* (2011) que l'effet toxique de l'EDTA est expliqué par la complexation des métaux traces essentiels par le ligand. Le fait que les métaux traces ne soient plus disponibles provoque une carence chez l'organisme.

L'effet de l'EDTA sur les nanoparticules métalliques est peu documenté. Ni la concentration en EDTA dans les fleuves au Canada, ni le mécanisme par lequel cette molécule interagit avec les nanoparticules ne sont connus. Cependant, il semblerait que l'EDTA puisse se lier aux nanoparticules par sorption (Chappell *et al.*, 2011).

CHAPITRE II : LES NANOPARTICULES ÉTUDIÉES

2.1 Les nanoparticules de magnétite, Fe_3O_4

2.1.1 Utilisation

La concentration de nanoparticules de magnétite dans l'environnement n'est pas connue. Toutefois, ces nanoparticules sont largement utilisées dans le domaine biomédical. Tout d'abord, elles servent à établir le diagnostic de cancer et le suivi lors du traitement par imagerie de résonance magnétique. En raison de leur stabilité, les Fe_3O_4 -NPs sont des agents de choix pour l'imagerie (Pankhurst *et al.*, 2009). De plus, les nanoparticules sont capables de cibler les cellules cancéreuses de deux façons: passive et active. Le ciblage passif se base sur l'effet de rétention et de perméabilité accrue qui fait en sorte que les nanoparticules ont tendance à s'accumuler davantage dans les tissus tumoraux que dans les tissus sains. Le ciblage actif se caractérise plutôt par un enrobage des nanoparticules par des ligands qui peuvent reconnaître les structures biologiques propres aux cellules cancéreuses (Revia et Zhang, 2015; Soenen *et al.*, 2010).

Elles sont aussi utilisées dans différents traitements médicaux. Dans les techniques de ciblage, l'insertion d'une aiguille magnétique dans un site permet de créer un champ magnétique. Ce site peut ensuite être ciblé par des macrophages chargés de nanoparticules magnétiques. Le cancer de la prostate peut être traité de cette façon. Ensuite, la thérapie génique emploie le même principe. Des brins de siARN (short-interfering ARN) sont introduits dans les cellules pour bloquer la fonction d'un gène en attachant des nanoparticules magnétiques au siARN pour les diriger vers les gènes

cibles. Les nanoparticules de magnétite trouvent aussi leur application dans le traitement du cancer du cerveau et de la prostate par thermothérapie. La thermothérapie consiste à augmenter la température des cellules cancéreuses afin de les affaiblir ou de les détruire (Pankhurst *et al.*, 2009).

Dans le domaine environnemental, les nanoparticules de magnétite peuvent être impliquées dans l'assainissement des eaux, car elles absorbent, entre autres, l'arsenic, le chrome et le nickel (Panneerselvam *et al.*, 2011; Sanchez *et al.*, 2011). La fonctionnalisation des nanoparticules avec des ligands tels que le chitosan, les acides humiques et fluviques et des déchets de thé permet d'accroître leur capacité d'absorption et la diversité de métaux qui peuvent être absorbés (Tang *et al.*, 2014; Huang et Keller, 2015). Les propriétés magnétiques de Fe_3O_4 -NPs permettent même d'utiliser un aimant pour les retirer de l'eau (Sanchez *et al.*, 2011).

2.1.2 Toxicité

Les nanoparticules de magnétite ne sont pas sans danger pour l'environnement. Des études ont montré qu'une concentration de 500mg/L provoquait une forte inhibition de la croissance de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (PTSOX4) (Rahed *et al.*, 2013).

Sur la microalgue *Chlorella vulgaris*, une variété d'effets sont observés tels que la diminution de l'indice de performance de la photosynthèse (78 %), la formation d'espèces réactives de l'oxygène (augmentation d'environ 35 %) et la diminution du taux de croissance (47,8 %) pour une concentration de 400mg/L pendant 72h (Barhoumi et Dewez, 2013). Les Fe_3O_4 -NPs influencent le contenu de l'algue *Chlorella vulgaris* en chlorophylle *a* (diminution d'environ 40 % à 200 mg/L), malondialdéhyde (augmentation d'environ 112,5 % à 1,6 g/L), glutathion (diminution

d'environ 52 % à 1,6 g/L) et diminue le taux net de photosynthèse (environ 27 % à 1,6 g/L) (Chen *et al.*, 2012).

Dans le domaine des plantes, l'exposition de *Lemna gibba* pendant 7 jours à des concentrations inférieures à 400mg/L a eu pour effet la diminution du taux de chlorophylle (115 %) et l'inhibition de la croissance (37 %). L'indice de performance de la photosynthèse était le biomarqueur le plus sensible. Il a diminué de 83 % (Barhoumi *et al.*, 2015).

Des études sur les concombres et les laitues ont démontré que 116 mg/L de Fe₃O₄-NPs cause une diminution du taux de germination d'environ 19,9 % pour les concombres et 22,7 % pour les laitues. De plus, l'élongation des racines était diminuée de 11,4 % pour les concombres et 21,5 % pour les laitues (Barrena *et al.*, 2009).

Chez les crustacés, les nanoparticules de magnétite diminuent le nombre de naissances des *Daphnia magna* jusqu'à 43,7 % à des concentrations de 10-100mg/L (Blinova *et al.*, 2015). Pour *Artemia salina*, les nanoparticules ne causent pas de mortalité, mais elles augmentent l'activité de la cholinestérase et de la catalase pour des concentrations de 10 à 100 mg/L après une exposition de 48 h. Les nanoparticules se bioaccumulent également dans leurs intestins (Gambardella *et al.*, 2014).

Finalement, l'inhalation de nanoparticules par les rats pendant 13 semaines provoque de l'inflammation au niveau des poumons et d'autres histopathologies comme des métaplasies. L'exposition cause également l'augmentation du nombre de neutrophiles dans le sang. La concentration la plus faible à laquelle aucun effet n'est observé (NOAEL) est de 4,7 mg/L (Pauluhn, 2012).

2.2 Les nanoparticules d'oxyde de cuivre, CuO

2.2.1 Utilisation

La concentration de nanoparticules d'oxyde de cuivre dans l'environnement n'est pas connue. Toutefois, ces nanoparticules trouvent de nombreuses applications dans plusieurs domaines. Elles sont utilisées pour leurs propriétés antimicrobiennes dans le domaine du textile. On les retrouve dans les tissus médicaux, vêtements de protection et les couvre-lits (Dastjerdi et Montazer, 2010; El-Nahhal *et al.*, 2012; Gabbay, 2006). Les nanoparticules d'oxyde de cuivre ont la particularité d'être un bon conducteur d'électricité. Elles peuvent être utilisées dans les nanofluides pour améliorer des échangeurs thermiques (Hwang *et al.*, 2006). La conductivité des films de CuO leur permet d'être utilisés pour le craquage de l'eau par photoélectrochimie (Chiang *et al.*, 2014). Les CuO-NPs ont l'avantage d'être stables à l'air contrairement aux Cu-NPs. Ainsi, l'emploi de CuO-NPs dans la fabrication d'électrodes de cuivre sur différents substrats est plus facile et moins coûteux que les Cu-NPs (Kang *et al.*, 2011). Finalement, elles possèdent des caractéristiques de sorbant qui peuvent être utilisées, par exemple, pour retirer l'arsenic de l'eau (McDonald *et al.*, 2015).

2.2.2 Toxicité

La toxicité des CuO-NPs envers différents organismes a été démontrée chez les bactéries. À une concentration de 125 mg/L, elles inhibent la croissance de *Escherichia coli* (80 %), *Bacillus subtilis* (95 %) et *Streptococcus aureus* (95 %) après 24h (Baek et An, 2011). Elles causent la mortalité de *Vibrio fischeri* (EC50 7,79 mg/L) après 15 minutes d'exposition (Rossetto *et al.*, 2014). L'effet toxique est fortement influencé par la libération des ions de Cu^{2+} par les nanoparticules (Shang *et al.*, 2015).

Les CuO-NPs causent une inhibition de la croissance chez les algues. La concentration efficace médiane (EC50) varie de 0,710 mg/L (*Pseudokirchneriella subcapitata*) à 150 mg/L (*Chlamydomonas reinhardtii*) (Aruoja *et al.*, 2009; Melegari *et al.*, 2013). Melegari *et al.* (2013) ont également observé une diminution de la chlorophylle totale (74 %), une diminution des caroténoïdes (82 %), une augmentation de la production des espèces réactives d'oxygène (190 %) et la peroxydation des lipides (73 %) pour une concentration de 1000 mg/L après 72h. L'activité de la catalase et du glutathion S-transférase augmentaient de 139 % et 75 % à une concentration de 1 et 1000 mg/L respectivement. Perreault *et al.*, (2012) ont obtenu une augmentation des espèces réactives d'oxygène (160 %) et une diminution de l'activité du photosystème II (78 %) chez *C. reinhardtii* après 6h de traitement à une concentration de 40 mg/L. Chez la diatomée *Thalassiosira weissflogii*, les NPs s'accumulent dans la paroi cellulaire (Bielmyer-Fraser *et al.*, 2014).

Chez les plantes, l'inhibition de la croissance est observée pour une EC50 de 4,5 g/L chez *Lemna gibba* (Perreault *et al.*, 2014). Les nanoparticules causent aussi des changements au niveau de l'ultrastructure et de la morphologie des cellules ainsi que la diminution de certains pigments photosynthétiques chez les *Lemna punctata* (Lalau *et al.*, 2015).

Les nanoparticules d'oxyde de cuivre ont un effet sur la reproduction des daphnies (crustacé). La valeur de l'EC50 va de 0,46 à 22 mg/L. Une concentration létale médiane (LC50) a été établie à 0,99 mg/L pour 48h d'exposition. De plus, une diminution de la croissance a été observée et des changements morphologiques comme l'absence de l'épine caudale et la malformation de la carapace (Adam *et al.*, 2015; Rossetto *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2012). Sur l'insecte d'eau douce *Allogamus ligonifer*, les CuO-NPs diminuent le taux de consommation de feuilles de 47 % et inhibent sa croissance de 46 % pour 75 mg/L. La LC50 est évaluée à 569 mg/L (Pradhan *et al.*, 2012).

Des tests chez les poissons ont démontré que les nanoparticules de CuO s'accumulent dans les branchies, le foie et les reins de la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* et du poisson rouge (Isani *et al.*, 2013, Ates *et al.*, 2014). Les nanoparticules causent aussi l'hémolyse et des dommages à l'ADN (Isani *et al.*, 2013). Elles peuvent retarder ou diminuer les chances d'éclosion des oeufs de poisson-zèbre en interférant avec les processus enzymatiques (Muller *et al.*, 2015). Finalement, des expériences sur l'alimentation du poisson rouge en artémies contaminées ont démontré que les nanoparticules peuvent se bioamplifier le long de la chaîne alimentaire (Ates *et al.*, 2014).

CHAPITRE III : LES BIOESSAIS

3.1 Artémies *nauplii*

Les artémies sont des petits crustacés de la classe des branchipodes. À maturité, elles mesurent de 8 à 10 mm (Vanhaecke *et al.*, 1987). Elles sont dispersées dans la nature par des activités humaines ou lorsque le vent ou l'écoulement de l'eau transporte les oeufs (United States Environmental Protection Agency (EPA), 2012). Il existe plusieurs espèces d'artémies répandues à travers le monde (fig. 3.1). Seulement l'une d'entre elles est considérée comme une espèce cosmopolite: *Artemia salina*.

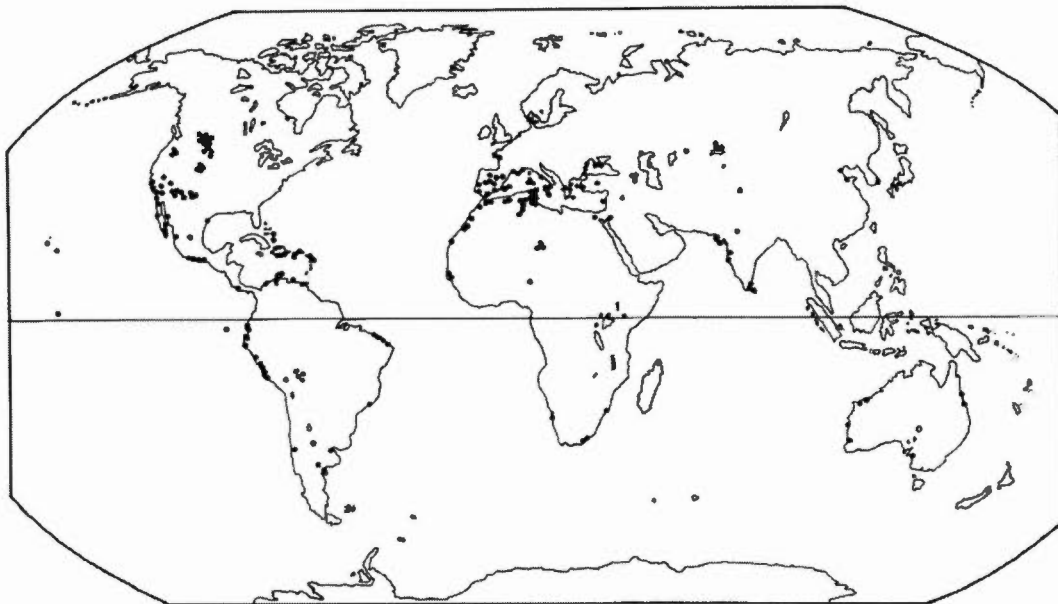


Figure 3.1. Distribution d'artémies dans le monde (Vanhaecke *et al.*, 1987).

Les artémies sont des organismes euryhalins capables de vivre dans différentes conditions de température et de pH. On les retrouve principalement dans des lacs ou

des bassins salés. Elles tolèrent une salinité allant de 5‰ à 50‰, des températures de 10 à 30°C et un pH neutre jusqu'à fortement alcalin (Persoone *et al.*, 1989). Les oeufs peuvent survivre à des températures inférieures à 0°C.

Ce sont des organismes qui filtrent et consomment des résidus organiques, des micro-algues et des bactéries. Pour cette raison, les artémies s'épanouissent très bien dans des lieux où il y a une efflorescence algale où elles peuvent se nourrir d'algues et de bactéries hétérotrophes. Elles sont chassées par de nombreux prédateurs comme les espèces de zooplancton retrouvées dans les eaux salées, les poissons d'eaux salées, certains insectes et certains oiseaux (United States Environmental Protection Agency (EPA), 2012).

Les œufs d'artémies deviennent activés lorsqu'ils sont hydratés. Après l'éclosion, les larves nauplius subissent plusieurs mues tout en passant à travers différents stades avant d'atteindre l'état adulte (United States Environmental Protection Agency (EPA), 2012) (fig. 3.2).

Lors du premier stade (instar I), le système digestif du nauplius n'est pas en contact avec le milieu externe. Il se nourrit donc de son vitellus. C'est lors du deuxième stade (instar II) que la larve nauplius peut commencer à consommer de la matière en suspension. Sans nourriture, les larves meurent au cours du troisième ou du quatrième stade (Sorgeloos *et al.*, 1978).

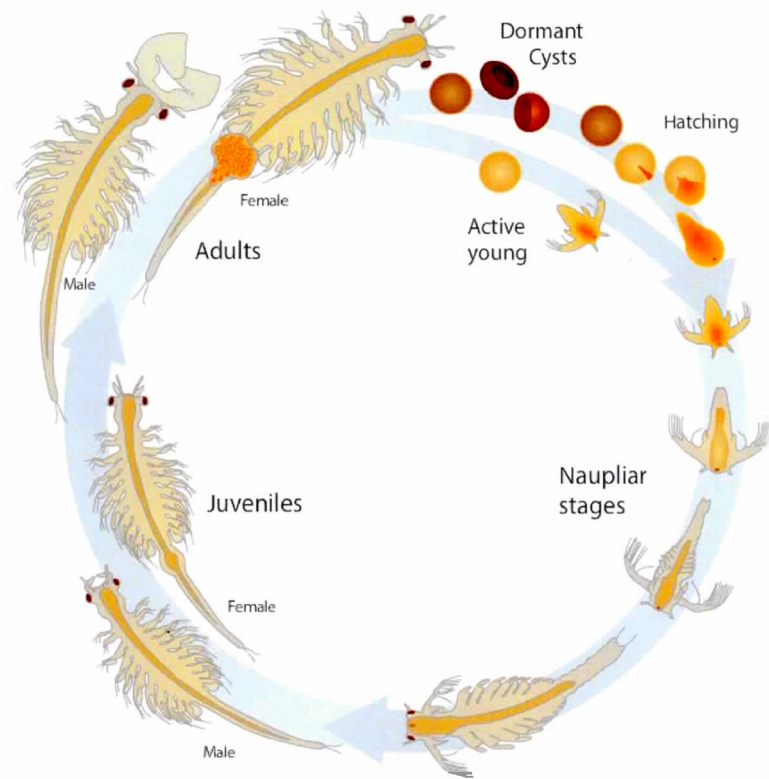


Figure 3.2. Cycle de vie des artémies (fishkeepingadvice.com).

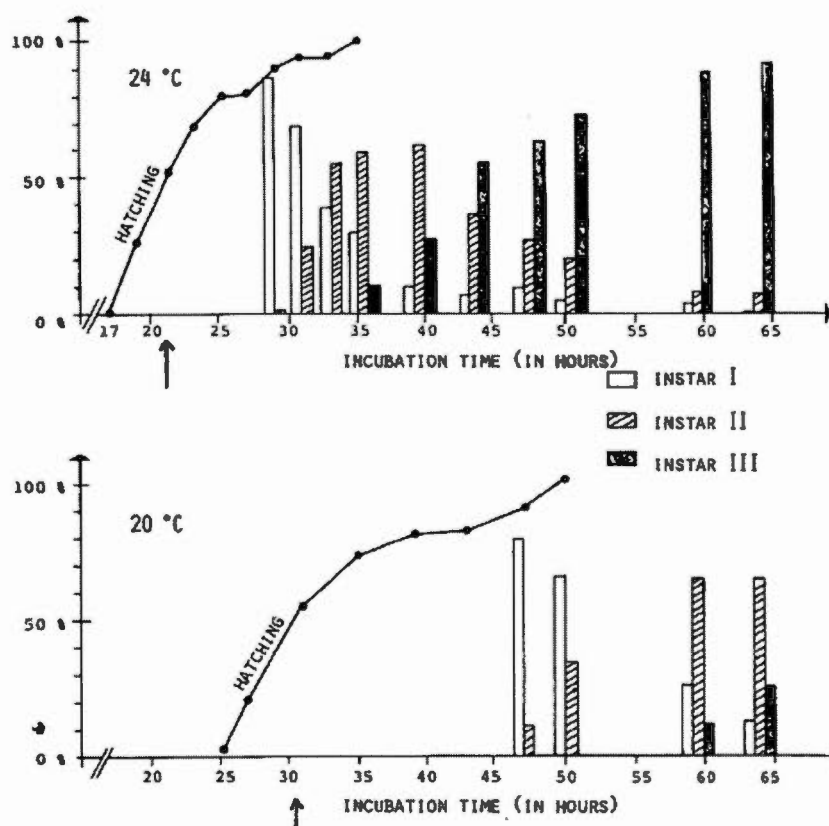


Figure 3.3. Influence de la température sur l'éclosion des artémies (Sorgeloos *et al.*, 1978).

La vitesse avec laquelle les larves éclosent et se développent dépend fortement de la température (fig. 3.3). À une température de 24°C, les premiers nauplius mettront moins de dix-sept heures à éclore et un peu plus de trente heures pour attendre le deuxième stade (instar II). À 20°C, les premières éclosions surviendront après vingt-cinq heures et le deuxième stade apparaît plus de vingt heures plus tard (Sorgeloos *et al.*, 1978).

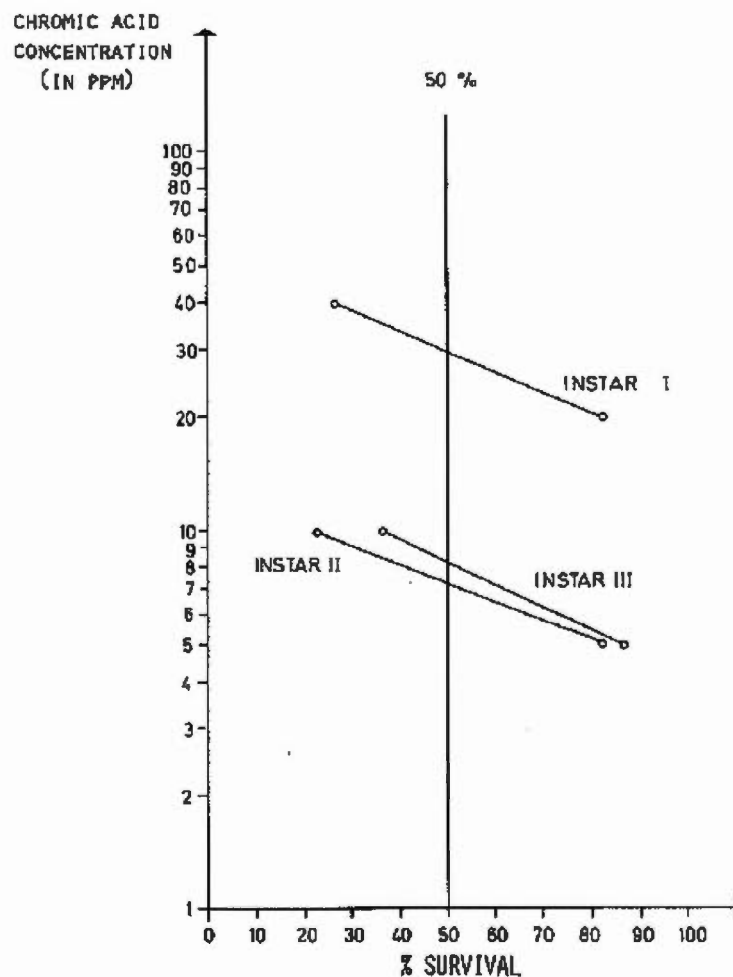


Figure 3.4. Sensibilité des différents instars à l'acide chromique (Sorgeloos *et al.*, 1978).

En raison de leurs différences physiologiques, les différents stades des larves nauplius ne possèdent pas la même sensibilité à l'acide chromique (Sorgeloos *et al.*, 1978). La figure 3.4 montre la viabilité des trois stades en présence d'acide chromique. Si les stades II et III (instar II et III) possèdent une sensibilité similaire, le premier stade (instar I) est singulièrement moins sensible. Ceci est expliqué par le fait que le système digestif du nauplius n'est pas en contact avec le milieu à ce stade (instar I).

Les artémies *nauplii* sont des organismes intéressants pour les bioessais. Les œufs ont la propriété de pouvoir être entreposés longtemps au congélateur. Les organismes peuvent donc être éclos au moment opportun. Comme les tests se font sur les premiers stades larvaires, il n'est pas nécessaire de les nourrir. Comme les artémies tolèrent plusieurs conditions de températures et de salinités (eau saumâtre à une eau marine), elles peuvent être un organisme intéressant pour tester l'effet de ces conditions sur la toxicité d'une substance.

Le temps standard pour les bioessais sur les artémies est de 48h. Cependant des bioessais de 14 jours ont été développés pour évaluer l'effet toxique d'une substance à moyen terme (Manfra *et al.*, 2012).

3.2 Algues vertes

Étant faciles à manipuler et demandant relativement peu d'entretien, les microalgues sont des organismes fréquemment utilisés en laboratoire (Harris, 2001). Parmi les différents genres, *Chlamydomonas* retient l'attention. Cette microalgue connaît différentes applications. En conditions anaérobiques à la lumière, elle est capable de produire de l'hydrogène qui pourrait être un jour utilisé comme énergie renouvelable (Harris, 2001). *Chlamydomonas* est aussi un genre qui peut être tolérant à certains métaux lourds (Hanikenne, 2003) et pourrait potentiellement être utilisé dans l'assainissement des eaux par phytoextraction (Rubinelli *et al.*, 2002; Wei *et al.*, 2011).

Chlamydomonas est une microalgue unicellulaire dont la physiologie est bien connue (fig. 3.5) (Harris, 2001). Le genre possède deux flagelles antérieures, un chloroplaste basal qui entoure le pyrénoïdes et une paroi cellulaire distincte. *Chlamydomonas reinhardtii* est l'espèce la plus répandue en laboratoire. Ceci est surtout dû à sa capacité à croître sans photosynthèse en utilisant l'acétate comme source de carbone

(Dent *et al.*, 2001). Les microalgues offrent plusieurs types de biomarqueurs d'effet létal et subléta: la viabilité et la mortalité cellulaire, l'inhibition du taux de division cellulaire et l'activité photosynthétique (Melegari *et al.*, 2013; Shiavo *et al.*, 2016; Meng *et al.*, 2015). Le genre *Chlamydomonas* est composé de nombreuses espèces d'eau douce comme *Chlamydomonas reinhardtii* et marines telles que *Chlamydomonas euryale* (Lewin, 1957). La possibilité d'utiliser deux espèces de *Chlamydomonas* pour évaluer l'effet d'un contaminant dans ces deux différents milieux tout en conservant une morphologie similaire fait de *Chlamydomonas* un genre d'autant plus intéressant pour les bioessais.

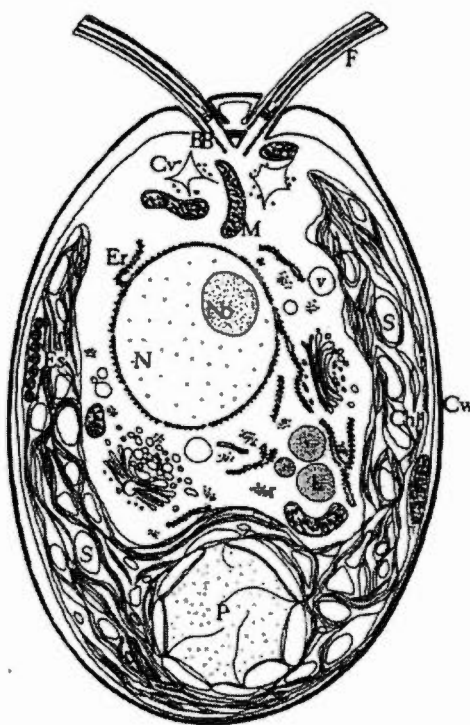


Figure 6. Morphologie d'une cellule de *Chlamydomonas* ; F, flagelle; BB, corpuscule basal ; Chl, chloroplastes; Cv, vacuole contractée; Cw, paroi cellulaire; Er, réticulum endoplasmique; Es, stigma; G, appareil de Golgi; L, lipide; Mi, mitochondrie; N, noyau; No, nucléole; P, pyrénoïde; R, ribosome; S, amidon; V, vacuole. (Harris, 2001).

CHAPITRE IV : MATÉRIEL ET MÉTHODES

4.1 La caractérisation des nanoparticules

4.1.1 Le diamètre hydrodynamique

Le diamètre hydrodynamique d'une particule est mesuré en utilisant le principe du mouvement Brownien. Le mouvement Brownien est le déplacement aléatoire de particules dans un liquide dû aux chocs entre les particules du liquide et celles étudiées. Ainsi, une particule dans un liquide est toujours en déplacement. Il existe une relation entre la vitesse de déplacement et la taille de la particule qui est définie par l'équation de Stokes-Einstein (Pecora, 1985) :

$$D = k_B T / 6\pi \eta R$$

Équation 4.1. Équation de Stokes-Einstein.

où D est le coefficient de diffusion, k_B est la constante de Boltzmann, T est la température absolue, η est la viscosité du medium et R est le rayon de la particule.

En principe, plus la particule est grosse, plus ses déplacements seront lents et plus elle est petite, plus ses déplacements seront rapides (fig. 4.1) (Malvern Instruments Ltd., 2004).

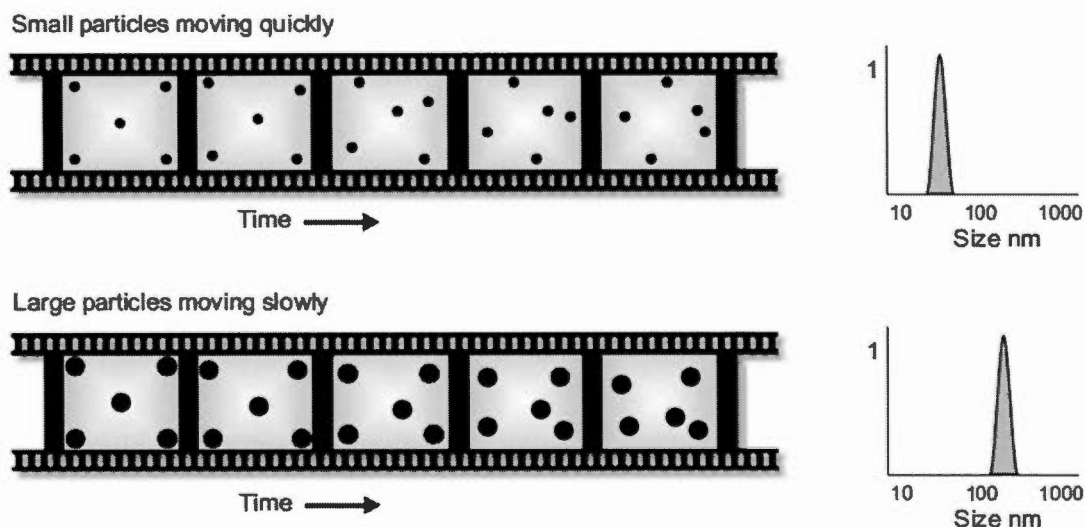


Figure 7. Illustration de la relation entre la taille et la vitesse de déplacement d'une particule (Malvern Instruments Ltd., 2004).

Pour mesurer le mouvement Brownien et en déduire la taille, le phénomène de la diffusion de la lumière est utilisé. Lorsqu'une particule est illuminée, elle diffuse la lumière dans toutes les directions (Hiemenz et Rajagopalan, 1997). Le détecteur est placé à 90° pour éviter de capter la lumière de la source. Selon le mouvement de la particule, l'intensité de la lumière diffusée change. Cette fluctuation est mesurée par l'appareil et des corrélations sont établies pour déterminer la taille (Pecora, 2000).

Dans le Zetasizer, les distributions de tailles peuvent être présentées selon trois types; nombre, volume et intensité. La distribution de taille selon l'intensité est la distribution de base obtenue par l'appareil. Dans cette distribution, l'aire est calculée selon la quantité de lumière diffusée: les plus grosses particules diffusent plus de lumière que les petites. Le même constat est fait pour une distribution par volume: les plus grosses molécules auront une plus grande aire sous la courbe, car leur volume est plus important. Finalement, une distribution par nombre montrera une aire sous la courbe proportionnelle au nombre de particules possédant la taille indiquée. Dans

l'exemple de la figure 4.2, l'échantillon contient un nombre égal de particules ayant 5 et 50nm (Malvern Instruments Ltd., 2004).

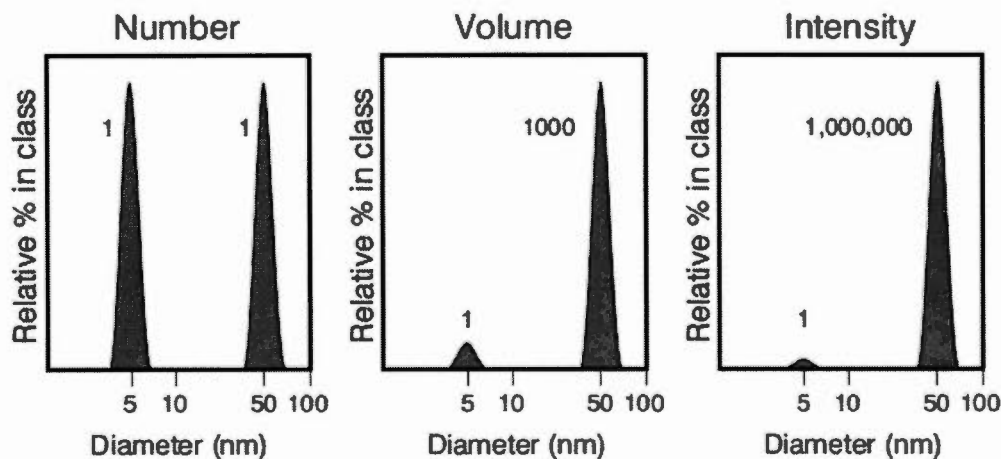


Figure 8. Les trois types de présentation de distributions de taille (Malvern Instruments Ltd., 2004).

Chacune de ces distributions possède ses avantages. Les distributions par volume et par intensité présentent une prédominance des particules ayant un diamètre hydrodynamique plus important. Tandis que dans la distribution par nombre, les petites particules sont aussi représentées que les grosses si elles sont de même quantité. Dans le présent travail, la distribution par nombre a été utilisée, pour obtenir une distribution conséquente à la population de l'échantillon.

Il a été remarqué que le nombre de mesures effectuées influence le résultat obtenu. Pour avoir une meilleure reproductibilité, un nombre de 15 mesures ont été effectuées pour l'analyse plutôt que d'employer l'ajustement automatique. Dans les solutions trop concentrées, la lumière diffusée par une particule peut être rediffusée par une autre. Ce phénomène est appelé *multiple scattering*. Pour éviter cette interférence, la concentration maximale utilisée est de 100mg/L (Allouni *et al.*, 2009).

4.1.2 Le potentiel Zêta

Le potentiel Zêta est la charge de la double couche électrique présente à la surface d'une particule dans un liquide (fig. 4.3) (Malvern Instruments Ltd., 2004).

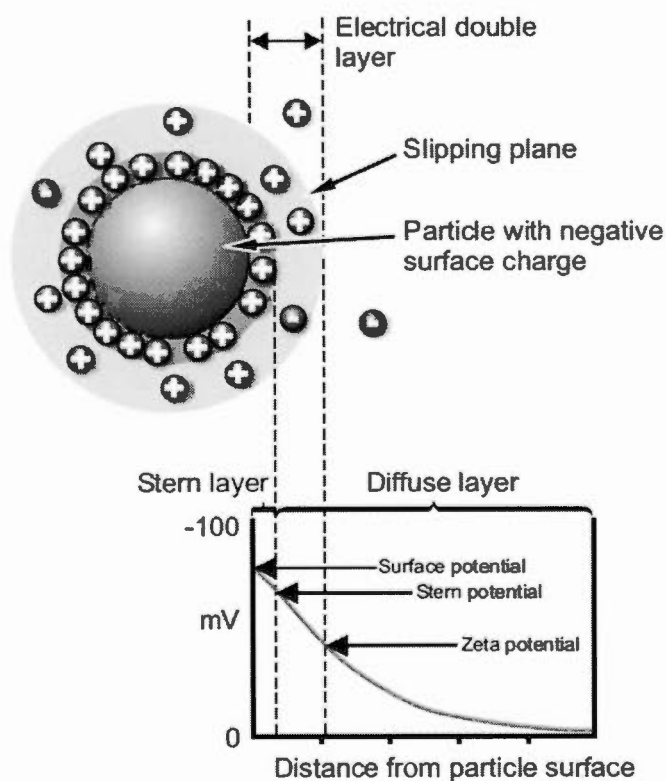


Figure 9. Double couche électrique d'une particule dans un liquide (Malvern Instruments Ltd., 2004).

Lorsqu'une particule ainsi chargée se trouve dans un champ électrique, elle se déplace vers le pôle positif ou négatif dépendamment de sa charge (Hunter, 1981). La vitesse avec laquelle la particule se déplace est proportionnelle à la grandeur de la charge (Brookhaven Instruments, 2002).

Lors de la mesure du potentiel Zêta, un laser passe à travers l'échantillon au moment où celui-ci subit à un champ électrique. Lorsque les particules se déplacent, il se

produit un décalage de fréquence (effet Doppler) de la lumière diffusée. Ce décalage est proportionnel à la vitesse de déplacement duquel le potentiel Zêta peut être déduit avec l'équation de Henry (Hunter, 1981) où ζ est le potentiel Zêta; U_E , la mobilité électrophoretique; ϵ , la constante diélectrique; η , la viscosité et $f(\kappa a)$, la fonction de Henry :

$$U_E = \frac{2\epsilon\zeta}{3\eta} \bullet f(\kappa a)$$

Équation 4.2. Équation de Henry

La fonction de Henry, $f(\kappa a)$, dépend de la forme de la particule (Hunter, 1981). Généralement, deux valeurs sont utilisées pour en faire une approximation : 1,5 (approximation de Smoluchowski) pour les solutions aqueuses ou les solutions ayant une concentration en électrolytes modérée et 1,0 (approximation de Huckel) pour les solutions ayant une constante diélectrique faible (Malvern Instruments Ltd., 2004).

4.1.3 La solubilité (Spectroscopie d'absorption atomique/ spectroscopie d'émission atomique)

Les techniques de spectroscopie atomique consistent à faire évaporer un échantillon liquide dans une flamme (fig. 4.4). L'analyte devient atomisé sous l'effet de la chaleur. En absorption atomique, une lampe à cathode creuse émet une lumière à la même fréquence de l'élément excité. Cette lumière est absorbée par les atomes de l'élément dans la flamme proportionnellement à la concentration de l'analyte (Harris, 2010).

Lors de l'émission atomique, les atomes sont excités par les collisions dans le plasma (ou une flamme). Pour retourner à l'état fondamental, ils émettent un photon qui est détecté par l'appareil. Encore une fois, la quantité de lumière émise est proportionnelle à la concentration de l'analyte dans l'échantillon. Un des avantages

de l'utilisation d'une torche à plasma est que l'analyte est déjà sec lorsqu'il atteint la flamme. Ainsi toute l'énergie du plasma sert à l'atomisation. Avec cette technique, une plus grande fraction de l'échantillon atteint le plasma qu'avec un nébuliseur conventionnel ce qui augmente la sensibilité de la technique (Harris, 2010).

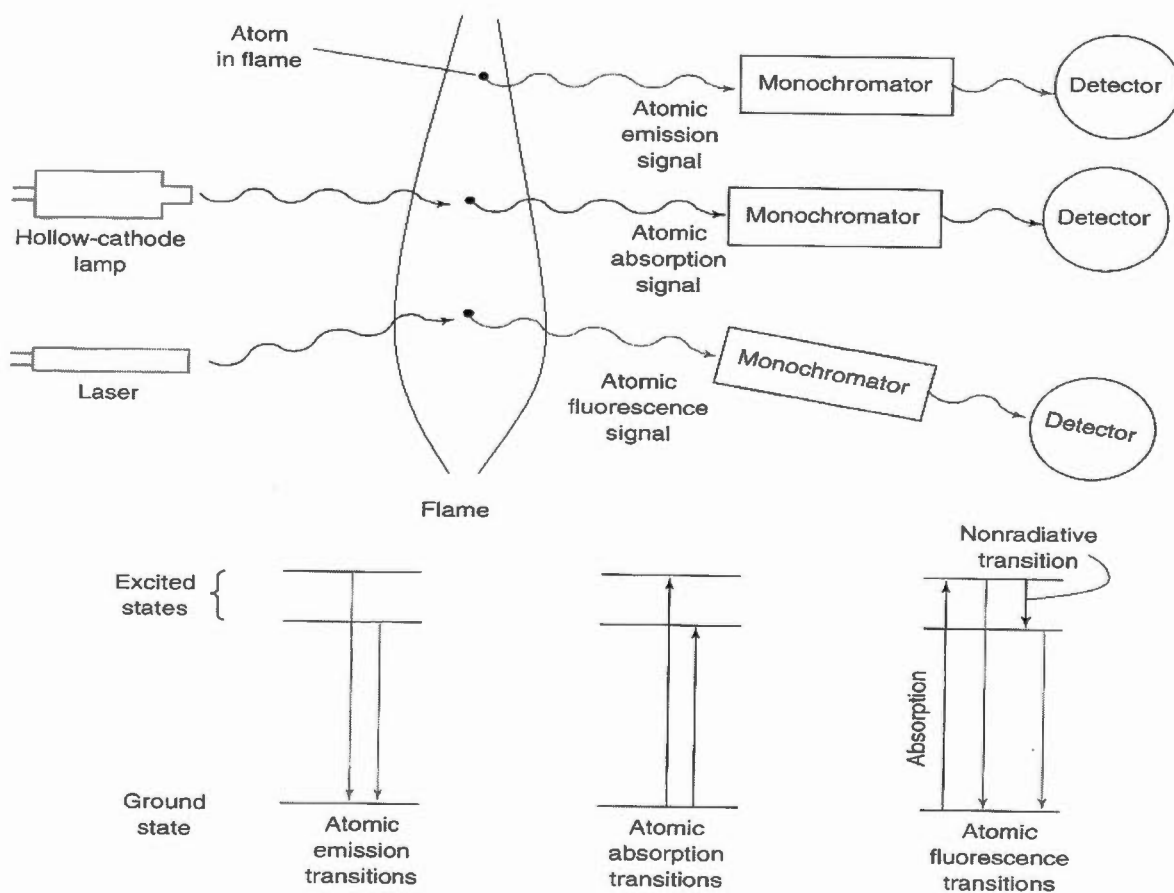


Figure 10. Spectroscopie d'absorption, d'émission et de fluorescence dans une flamme (modifié de Harris, 2010).

4.2 Les cultures d'algues

Chlamydomonas reinhardtii et *Chlamydomonas euryale* ont été cultivées sous un régime de lumière constante de $100 \pm 20 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ à l'aide de lampes fluorescentes T5HO de Sunblaster. Les cultures sont sous une agitation de 90 rpm dans le milieu HSM pour l'espèce d'eau douce. L'espèce marine ne pouvant survivre en eau douce, la salinité du milieu a été augmentée à 10 et 32 g/L en ajoutant du chlorure de sodium. La température a été maintenue à $23 \pm 1^\circ\text{C}$.

La densité cellulaire a été évaluée à l'aide du compteur de cellules Multisizer Z3 et l'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 750 nm avec un spectromètre UV-vis Cary 60 (Agilent Technologies, Santa Clara, Californie, É.U.). Les courbes d'étalonnage ont été produites avec ces deux paramètres (fig. 4.5 A et B). L'équation linéaire obtenue pour *Chlamydomonas reinhardtii* est $y=5,5994A + 0,0408$, où «y» est la densité cellulaire et «A» l'absorbance. L'équation linéaire pour *Chlamydomonas euryale* est $y=3,5420A-0,0048$ à une salinité de 10 g/L et $y=5,9378A+0,0128$ à une salinité de 32g/L.

Les courbes de croissance (fig. 4.5 C) ont été obtenues en mesurant l'absorbance des algues pendant 4 jours. L'absorbance était convertie en densité cellulaire à l'aide des équations d'étalonnage.

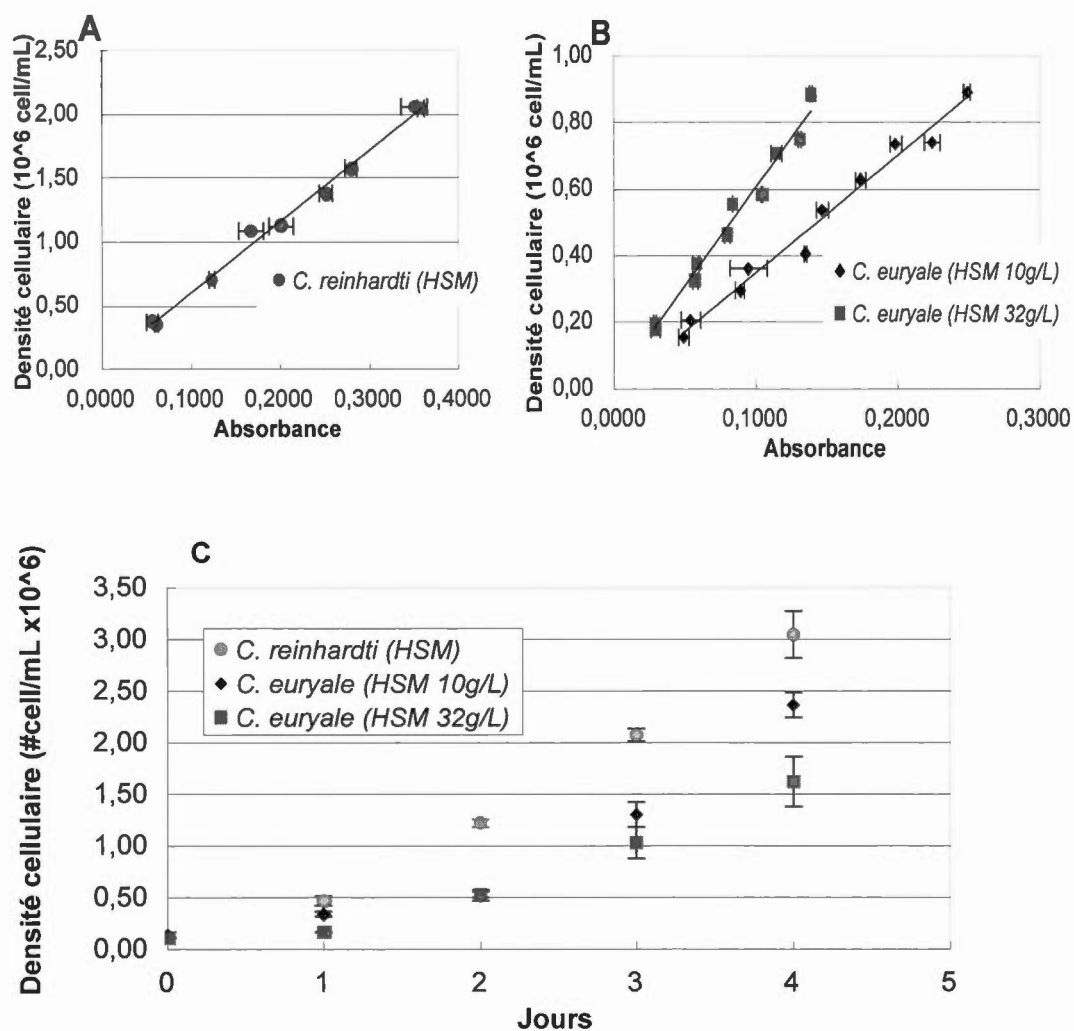


Figure 11. Courbes d'étalonnage des cultures de *Chlamydomonas reinhardtii* (A) et *Chlamydomonas euryale* (B) et courbes de croissance (C) dans le milieu HSM et HSM modifié aux salinités de 10 et 32g/L.

4.3 La cinétique rapide de la fluorescence chlorophyllienne

La cinétique rapide de la fluorescence chlorophyllienne nous informe sur l'équilibre physiologique de l'algue par son activité photosynthétique (Krause, 1988; Lichtenhaler et Rinderle, 1988). L'appareil photosynthétique est composé, entre autres, du photosystème II (PSII) qui est un complexe membranaire présent dans les thylakoïdes. Il permet à l'algue d'absorber la lumière lors de la photosynthèse pour produire de l'énergie (Ort et Withmarsh, 2001). Le photosystème II est composé d'un groupe de chlorophylles *a* appelé P680. Lorsque P680 est excitée par un photon, elle transfère un électron à une quinone (Q_A) par le biais d'une phéophytine (PHEO). Q_A est ensuite réduite par une plastoquinone (Q_B). Entre temps, la PHEO peut récupérer un électron en oxydant une tyrosine (TYR) qui sera à son tour réduite par une molécule d'eau (Stirbet et Strasser, 2001). Lorsque la quinone Q_A est réduite, on dit que le centre est fermé, car il ne peut plus recevoir d'électron (fig. 4.6). S'il y a une nouvelle photoexcitation dans cet état, le transfert chimique ne peut pas avoir lieu. Alors, l'énergie est perdue sous forme de chaleur ou de fluorescence (Dysens et Sweers, 1963; Strasser *et al.*, 2004).

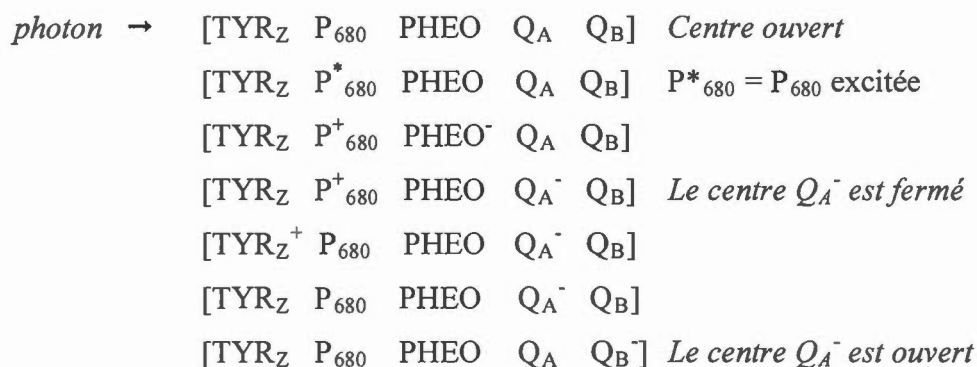


Figure 12. Étapes du transfert d'électrons (modifié de Cornic, 2007).

Pour mesurer la cinétique rapide de la fluorescence chlorophyllienne, l'échantillon doit d'abord s'être acclimaté à l'obscurité. À ce moment, tous les centres sont

ouverts. Lors de la mesure, l'échantillon est soumis à une forte intensité lumineuse qui entraîne la fermeture des centres et donc une augmentation de la fluorescence (Munday et Govindjee, 1969; Delosme, 1967; Stirbet et Govindjee 2011). La figure 4.7 illustre les transitions O-J-I-P correspondant aux différents états de réduction des quinones [Q_A et Q_B] et aux paramètres F_0 , F_m et F_v (tab. 4.1) :

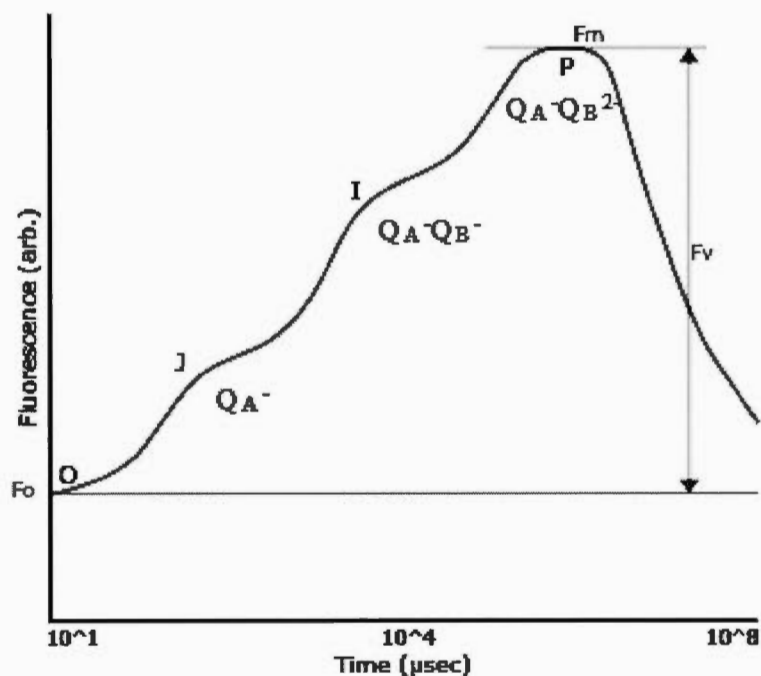


Figure 13. Cinétique rapide de la fluorescence (élaboré de Strasser *et al.*, 2004).

Durant les 20 premières μs , l'émission de fluorescence est linéaire parce qu'elle représente la fluorescence des pigments chlorophylliens (chlorophylle *a*) qui ne participent pas aux réactions photochimiques du centre réactionnel. Il s'agit de la fluorescence émise à la transition O où tous les centres réactionnels du PSII sont ouverts (Strasser *et al.* 1995). La transition J, quant à elle, correspond à l'émission de fluorescence quand toutes les Q_A sont réduites. Par la suite, lorsque toutes les Q_A sont réduites et que Q_B devient réduite pour la première fois, l'émission de fluorescence observée correspond à la transition I. Finalement, lors de la transition P,

les Q_A sont réduites et les Q_B sont réduites pour une deuxième fois (Strasser *et al.* 1995).

Tableau 4.1. Définition des paramètres de la cinétique rapide de fluorescence chlorophyllienne (Strasser *et al.*, 2004).

Paramètre	Définition	Équation
F_0	Intensité de fluorescence de base déterminée à 20 μ s	-
F_m	Intensité de fluorescence lorsque tous les centres réactionnels du PSII sont fermés	-
F_v	Fluorescence variable	$F_M - F_0$
F_v/F_m	Rendement quantique maximum de la photochimie du PSII	$(F_M - F_0)/F_M$
V_J	Fluorescence variable à la transition J déterminée à 2 ms	$\frac{F_{2ms} - F_0}{F_M - F_0}$
M_0	Taux de fermeture des centres réactionnels	$4 \times \frac{F_{300\mu s} - F_0}{F_M - F_0}$
P.I.	Indice de performance de l'activité du PSII	$\left(\frac{1 - F_0/F_M}{M_0/V_J} \right) \times \frac{F_M - F_0}{F_0} \times \frac{1 - V_J}{V_J}$

4.4 La viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire a été déterminée à l'aide du cytomètre en flux BD Accuri. La cytométrie en flux consiste à faire passer individuellement les cellules d'un échantillon sous un faisceau laser (fig. 4.8) (Brunsting, 1974). Les informations obtenues à partir de la lumière diffusée caractérisent la morphologie de la cellule

(taille, forme, granulosité, etc.) tandis que la fluorescence d'un marqueur peut donner des informations sur des paramètres biochimiques (Arsenault *et al.*, 1993).

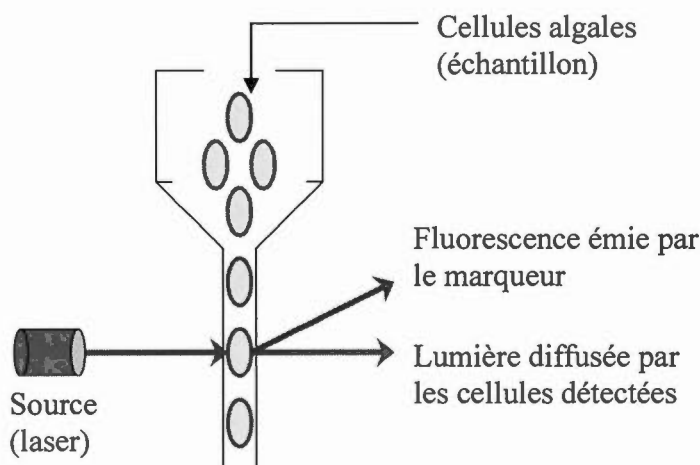


Figure 14. Représentation schématique de la cytométrie en flux (modifié de Arsenault *et al.*, 1993).

L'iodure de propidium (IP) (fig. 4.9) est un marqueur fluorescent efficace pour évaluer la viabilité cellulaire (Williams *et al.*, 1998; Bunthof *et al.*, 1999). Au cours de l'expérience, il a été utilisé à une concentration de 40 μM . L'IP est un agent qui s'intercale entre les acides nucléiques de l'ADN ou de l'ARN de façon non spécifique. Il est incapable de traverser une paroi cellulaire. Ainsi, il ne peut pénétrer dans une cellule que lors de l'apoptose ou de la nécrose lorsque la paroi cellulaire est détruite. La présence de l'IP dans une cellule est donc caractéristique d'une cellule morte marquée (Yeh *et al.*, 1981). Lorsqu'il est lié, le maximum d'excitation de l'IP est à la longueur d'onde de 535 nm et son maximum d'émission est à 617 nm (fig 19). La fluorescence de l'iodure de propidium est mesurée à une longueur d'onde de 585 nm, tandis que la fluorescence de la chlorophylle, caractérisant la viabilité cellulaire, est mesurée à 670 nm (<https://www.thermofisher.com>).

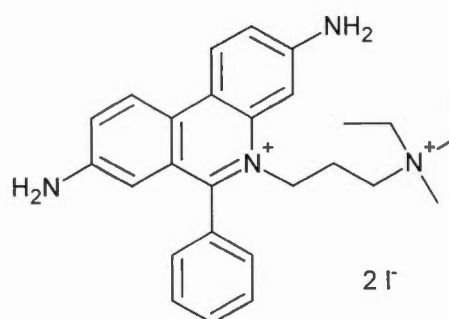


Figure 15. Structure de l'iodure de propidium (IP) (reproduite à partir de <https://www.thermofisher.com> à l'aide du logiciel ACD/ChemSketch).

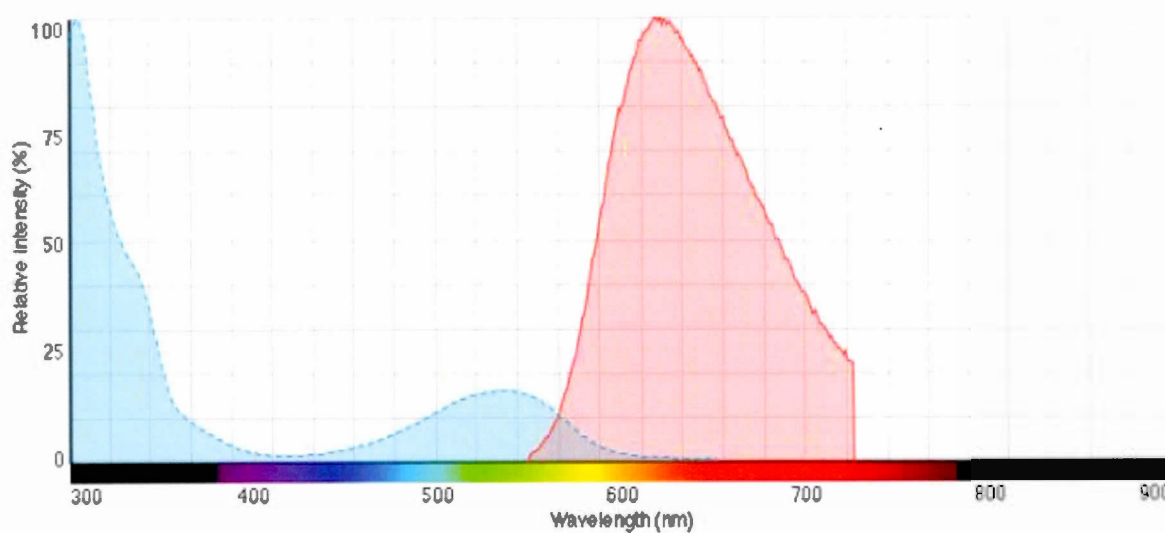


Figure 16. Spectre de fluorescence de l'iodure de propidium (excitation [bleu] et émission [rouge]) (reproduit de <https://www.thermofisher.com>).

CHAPITRE V : EFFET DE L'EDTA ET DE LA SALINITÉ SUR LES PROPRIÉTÉS DES NANOPARTICULES DE MAGNÉTITE ET D'OXYDE DE CUIVRE EN MILIEU AQUEUX.

Émilie Canuel, Cleiton Vaz, Hermine Betis, David Dewez*

Université du Québec à Montréal, Département de chimie
2101 rue Jeanne-Mance, Montréal, Québec, Canada

*Dans ce projet, j'ai réalisé tous les travaux expérimentaux. J'ai effectué les tests de létalité sur les artémies avec Cleiton Vaz (chercheur postdoctoral invité). J'ai caractérisé les nanoparticules (diamètre hydrodynamique, potentiel Zêta, solubilité) de magnétite avec l'assistance d'Hermine Betis (stagiaire de 1^{er} cycle) dans le milieu Instant Ocean. J'ai fait les bioessais (viabilité cellulaire, inhibition de la croissance, performance de l'activité photosynthétique) sur les deux espèces d'algues vertes *Chlamydomonas reinhardtii* et *Chlamydomonas euryale*, et j'ai caractérisé (diamètre hydrodynamique, potentiel Zêta, solubilité) les nanoparticules de magnétite et d'oxyde de cuivre dans le milieu HSM aux différentes salinités (0, 10 et 32g/L). Finalement, j'ai calculé la force ionique des différents milieux HSM et Instant Ocean avec le logiciel MINEQL+. J'ai effectué le traitement des données obtenues et la présentation des résultats. Finalement, j'ai interprété les résultats obtenus et j'ai rédigé ce chapitre sous la forme d'un article scientifique.*

5.1 Résumé

Les paramètres environnementaux ont une grande influence sur les propriétés physico-chimiques des NPs. Ces propriétés déterminent ensuite la biodisponibilité et donc la toxicité des NPs. Pour évaluer l'effet des propriétés physico-chimiques sur la toxicité, l'impact de facteurs environnementaux (la salinité et la présence de l'EDTA) sur la toxicité des Fe_3O_4 -NPs et des CuO-NPs ont été évalué sur *Artemia sp.*, *Chlamydomonas reinhardtii* et *Chlamydomonas euryale*. Les résultats montrent que les Fe_3O_4 -NPs ne sont pas toxiques pour *Artemia sp.* dans les conditions testées. Les CuO-NPs ont un effet létal significatif qui diminue avec l'augmentation de la salinité et la présence de l'EDTA. Il a été remarqué que les deux NPs peuvent se bioaccumuler dans les intestins des artémies. Les CuO-NPs ne diminuent pas la viabilité cellulaire de *C. reinhardtii* de façon significative. L'EDTA a un effet toxique sur *C. reinhardtii* en produisant un effet de carence avec une mortalité de 100% à l'intérieur de 48h pour une concentration de 100mg/L. L'EDTA diminue également le taux de division cellulaire et l'indice de performance de la photosynthèse tandis que la présence des NPs a un effet stimulant sur ces deux paramètres. La présence de l'EDTA augmente considérablement la solubilité des CuO-NPs sans toutefois augmenter la toxicité des NPs. L'augmentation de la salinité diminue l'effet des NPs et de l'EDTA sur *Artemia sp.*, *C. reinhardtii* et *C. euryale*. Ce phénomène peut être expliqué par l'augmentation de la taille des agglomérats avec la salinité et une plus grande présence d'ions dans le milieu qui pourraient empêcher l'EDTA de chélater d'autres métaux. Ces résultats confirment que la toxicité des NPs est en partie déterminée par leurs propriétés physico-chimiques qui sont elles-mêmes influencées par les paramètres du milieu.

5.2 Introduction

Les nanoparticules de magnétite (Fe_3O_4 -NPs) et les nanoparticules d'oxyde de cuivre (CuO -NPs) sont utilisées dans une grande variété d'applications. Les Fe_3O_4 -NPs sont énormément utilisées dans le domaine médical pour l'imagerie de résonance magnétique et différents traitements médicaux (Pankhurst *et al.*, 2009; Panneerselvam *et al.*, 2011). Dans le domaine environnemental, elles peuvent être employées pour le traitement des eaux (Sanchez *et al.*, 2011; Tang *et al.*, 2014; Huang et Keller, 2015). Les CuO -NPs sont utilisées dans les tissus pour leurs propriétés antimicrobiennes, et pour la fabrication de produits électroniques (Dastjerdi et Montazer, 2010; Chiang *et al.*, 2014; Hwang *et al.*, 2006). À long terme, la fabrication et l'utilisation de ces technologies entraînent le risque que ces nanoparticules soient relâchées dans l'environnement soit au cours de la fabrication, de l'utilisation ou de la dégradation des produits de consommation (Gottschalk et Nowack, 2011).

L'effet des nanoparticules et le risque qu'elles comportent pour l'environnement ne sont pas bien compris. Le comportement des nanoparticules dépend de leurs propriétés physico-chimiques comme la nature, la forme, la taille, l'aire de surface et la charge de surface. Ce sont ces caractéristiques qui déterminent leur toxicité envers les organismes vivants (Oberdörster *et al.*, 2005). Certaines de ces propriétés sont elles-mêmes influencées par les paramètres de l'environnement comme la lumière, le pH, la température, la salinité et la présence de ligands (Matranga et Corsi, 2012). Les caractéristiques du milieu peuvent donc avoir un impact sur la toxicité des nanoparticules.

Les Fe_3O_4 -NPs et les CuO -NPs se sont avérés toxiques pour une variété d'organismes comme les bactéries *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et *Streptococcus aureus* (Baek et An, 2011; Raheb *et al.*, 2013), les microalgues *Chlorella vulgaris*, *Pseudokirchneriella subcapitata* et *Chlamydomonas*

reinhardtii (Aruoja *et al.*, 2009; Melegari *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2012) et les crustacés *Artemia salina* et *Daphnia magna* (Gambardella *et al.*, 2014; Adam *et al.*, 2015). Toutefois peu d'études se sont portées sur la relation entre les paramètres environnementaux et la toxicité de nanoparticules pour un même organisme.

Les ligands organiques présents dans l'environnement ont la capacité de se lier aux métaux et nanoparticules métalliques et d'influencer leur biodisponibilité. Par exemple, l'éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) est fréquemment utilisé dans les milieux de culture pour solubiliser les métaux traces comme le fer (Hamm, 1996). Celui-ci peut être ensuite plus facilement absorbé par les microalgues (Hamm, 1996; Ward *et al.*, 2002). Il a été démontré que l'EDTA et l'acide fulvique diminuent la toxicité du cuivre sur l'algue *Scenedesmus subspicatus* en complexant les ions (Ma *et al.*, 2003). Dans le cas des nanoparticules métalliques, les ligands organiques auraient tendance à stabiliser leur agglomération en solution par des effets électrostatiques et stériques (Deodarine *et al.*, 2011; Hsu-Kim et Lau, 2008; Kennedy *et al.*, 2012). L'effet des ligands organiques sur la toxicité des nanoparticules métalliques non fonctionnalisées a peu été étudié, mais leur présence pourrait aussi bien augmenter que diminuer la biodisponibilité des nanoparticules. Wang *et al.* (2011) a démontré que l'acide fulvique de la rivière Suwannee (SRFA) augmente la toxicité des CuO-NPs chez l'algue *Microcystis aeruginosa* en favorisant la dissolution du cuivre et les interactions entre les ions de cuivre et la paroi cellulaire.

L'EDTA est la molécule organique retrouvée en plus grande concentration dans les fleuves (Evangelou *et al.*, 2007). Ceci est probablement dû au fait qu'elle ne se dégrade pas facilement et qu'elle est utilisée dans les détergents, le traitement des eaux, l'industrie de pâte et papier et comme conservatif dans les produits alimentaires (Brul et Coote, 1999; Oviedo et Rodríguez, 2003). En forte concentration, L'EDTA a la capacité de lier complètement les métaux traces et de les rendre non biodisponibles pour l'organisme, causant ainsi un effet toxique. Ce phénomène a été observé sur

l'algue *Desmodesmus subspicatus* et les crustacés *Daphnia magna* et *Artemia salina* (Straub *et al.*, 2012; Moyo et Tandlich, 2014; Arruda *et al.*, 2010).

Jusqu'à aujourd'hui, l'effet combiné des nanoparticules et de l'EDTA sur l'environnement n'est pas bien connu. Le présent projet vise à déterminer l'effet de la présence de l'EDTA sur les propriétés chimiques et toxicologiques des Fe₃O₄-NPs et des CuO-NPs en milieu marin et en eau douce. Pour ce faire, des tests de létalité ont été conduits sur *Artemia sp.*, et la mesure du taux de division cellulaire, de la viabilité cellulaire et de la cinétique rapide de la fluorescence chlorophyllienne ont été réalisés sur les espèces *Chlamydomonas reinhardtii* et *Chlamydomonas euryale*. Les résultats de ce projet permettront d'acquérir une meilleure compréhension de l'effet de la salinité et de l'EDTA sur les propriétés physico-chimiques et la toxicité de ces nanoparticules métalliques.

5.2 Matériel et méthodes

5.2.1 Matériel biologique

L'algue verte d'eau douce *Chlamydomonas reinhardtii* (CC-125) provient de Duke University, É.U. et l'algue verte marine *Chlamydomonas euryale* (2274) provient d'UTEX (É.U.). Toutes deux ont été cultivées dans le milieu HSM selon le Canadian phycological culture center : NH₄Cl 500 µg/mL; MgSO₄.7H₂O 20 µg/mL; CaCl₂ 10 µg/mL; KH₂PO₄ 740 µg/mL; K₂HPO₄ 1,44 mg/mL; H₃BO₃ 185,5 µg/mL; MnCl₂.4H₂O 415,4 µg/mL; ZnCl₂ 3,3 µg/mL; FeCl₃.6H₂O 159,8 µg/mL; Na₂EDTA.2H₂O 300,0 µg/mL; CoCl₂.6H₂O 2,6 µg/mL; Na₂MoO₄.2H₂O 7,3 µg/mL; CuCl₂.2H₂O 0,012 µg/mL. Le pH est ajusté à 7,0 ± 0,1. L'espèce marine ne pouvant survivre en eau douce, la salinité a été modifiée en ajoutant du chlorure de sodium (10 et 32 g/L). Les algues ont été cultivées sous un régime de lumière

constante à l'aide de lampes fluorescentes à $100 \pm 20 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ à une agitation de 90 rpm à $23 \pm 1^\circ\text{C}$.

Les oeufs *Artemia sp* proviennent d'Aquatic Lifeline, Utah, É.U. Ils sont entreposés dans une boîte de conserve à environ -15°C jusqu'à utilisation.

5.2.2 Calcul de la force ionique des milieux

La force ionique des différents milieux de culture a été calculée avec le logiciel MINEQL+ v.4.62.3.

5.2.3 Caractérisation physico-chimique des nanoparticules

Les nanoparticules de magnétite (Fe_3O_4) (20 nm, sphériques) proviennent de MTI corporation (Richmond, É.U.). Les nanoparticules d'oxyde de cuivre (CuO) (taille <50 nm, sphérique) ont été obtenues chez Aldrich (Darmstadt, Allemagne). Avant la caractérisation, les nanoparticules sont dispersées en solution à l'aide d'un Ultrasonicateur (sonde 1/4'') (Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, É.U.) à une amplitude de 30% pendant 2 minutes. Elles sont ensuite incubées pendant 1 heure à la température de la pièce.

Le potentiel Zêta des nanoparticules a été mesuré à l'aide d'un ZetaPlus (BrookHaven Instrument Corp., Long Island, É.U.). La distribution de taille est obtenue avec le Zetasizer Nano S90 (DLS) (Malvern, Worcestershire Royaume-Uni.).

La méthodologie employée pour déterminer la solubilité des nanoparticules est fortement inspirée d'Oukarroum *et al.* (2014). Les échantillons sont préparés comme expliqué précédemment. Puis, ils sont laissés à sédimenter pendant 24 h. Par la suite, les échantillons sont centrifugés à une vitesse de 12000 g pendant 30 min avec une

centrifugeuse J2-HC (rotor JA-20) (Beckman, Fullerton, Californie, É.U.). Un volume de 5 mL de surnageant est prélevé auquel est ajouté 5 % d'acide nitrique. Puis, l'échantillon est analysé par Spectroscopie d'absorption atomique, Varian spectrAA 220 FS (Santa Clara, Californie, É.U.) pour les CuO-NPs dans le milieu Instant Ocean ou par spectrométrie d'émission atomique avec ionisation au plasma (ICP-OES), modèle 5100 (Agilent Technologies, Santa Clara, É.U.) pour les CuO-NPs dans les milieux HSM et les Fe₃O₄-NPs. Avant la mesure, le surnageant a été analysé au Zetasizer pour vérifier que l'échantillon était exempt de nanoparticule.

5.2.4 Exposition aux contaminants

Les concentrations de magnétite et d'oxyde de cuivre dans l'environnement ne sont pas connues. Les artémies *nauplii* et les algues vertes ont été exposées à 50 et 100 mg/L de Fe₃O₄-NPs et CuO-NPs à des salinités de 10 et 32 g/L pour *Artemia sp.* et *Chlamydomonas euryale* et 0 g/L (eau douce) pour *Chlamydomonas reinhardtii*.

Une solution stock d'EDTA (acide libre, Anachemia Canada inc., Canada) est préalablement préparée à une concentration de 400mg/L dans chaque milieu de culture. Lors de l'exposition, le volume adéquat de la solution stock d'EDTA est ajouté pour obtenir les concentrations de 10 et 100 mg/L. Le pH de la solution stock d'EDTA est préalablement ajusté au pH de milieu : soit 7 pour HSM et 8.1 pour HSM de 10 et 32 g/L et les milieux Instant Ocean.

5.2.5 Bioessais sur les artémies *nauplii*

L'éclosion des artémies est réalisée en mettant 500 mg d'oeufs dans 200mL de solution Instant Ocean (10 ou 32ppt). La solution est oxygénée à l'aide d'une pompe à air à une température d'environ 24 ± 1°C. Après 48 h, les artémies *nauplii* écloses sont recueillies dans une ampoule à décantation. Une lampe est placée au-dessus de

l'ampoule permet de les séparer les artémies des œufs, car les premières sont attirées par la lumière. Les artémies nagent donc vers le haut tandis que les œufs sédimentent dans le bas de l'ampoule.

Le bioessai est effectué selon la procédure : *Metodo estatico de determinacao de toxicidade aguda para artemia salina (Leach 1812), Departamento ambiental, avril 1990*. Les artémies *nauplii* sont exposées dans un volume total de 25mL de contaminant dans le milieu Instant Ocean (Atkinson et Bingman, 1998) dans des contenants de plastique avec couvercle. Un nombre de 10 artémies *nauplii* sont placées dans chaque contenant. Le témoin représente l'exposition du milieu non contaminé aux NPs et à l'EDTA. Après 48 heures, les artémies *nauplii* mortes sont comptées.

5.2.6 Bioessais sur les algues vertes

Les algues vertes en phase exponentielle sont exposées dans 20 mL de milieu de traitement pendant 72 heures à une densité initiale de 500000 cell/mL. La mesure du taux de croissance, la cinétique rapide de la fluorescence chlorophyllienne et la viabilité cellulaire sont évaluées à 24 h, 48 h et 72 h.

5.2.6.1 Inhibition de la croissance

La densité cellulaire des algues est déterminée à partir de l'absorbance à 750nm avec un Spectro UV-vis Cary 60 (Agilent technologies, Santa Clara, Californie, É.U.). Pour chaque mesure, le blanc est effectué avec une solution de culture contaminée par les NPs et l'EDTA à la même concentration que l'échantillon à analyser. Ainsi, seulement l'absorbance des algues est mesurée. La densité cellulaire est calculée à partir de la relation entre l'absorbance et la densité cellulaire mesurée à l'aide du compteur de cellules Multisizer Z3 (Beckman Coulter Inc, Fullerton, CA). Le taux

relatif de division cellulaire (RCDR) était ensuite calculé à l'aide de l'équation 5.1 où W_{72h} est la densité cellulaire après 3 jours et W_0 est la densité cellulaire au temps initial:

$$RCDR = (\ln W_{72h} - \ln W_0) / 72h$$

Équation 5.1. Taux relatif de division cellulaire (RCDR)

5.2.6.2 Cinétique rapide de la fluorescence chlorophyllienne

La cinétique rapide de la fluorescence chlorophyllienne a été mesurée à l'aide de l'appareil Handy-PEA (Hansatech Ltd. Norfolk, UK). Un volume de 2 mL de l'échantillon d'algue était prélevé et adapté à l'obscurité pendant 15 min avant la mesure. L'intensité lumineuse était de 1500 μmol de photons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ et le temps d'illumination était de 6 s. L'indice de performance du PSII est calculé selon l'équation 5.2 :

$$P..I. = \left(\frac{1 - F_0 / F_M}{M_0 / V_J} \right) \times \frac{F_M - F_0}{F_0} \times \frac{1 - V_J}{V_J}$$

Équation 5.2. Indice de performance du PSII

ABS/RC est le ratio de la proportion des centres réactionnels actifs par rapport à la taille effective des antennes chlorophylliennes; F_M est l'émission de fluorescence lorsque tous les centres réactionnels du PSII sont fermés (fluorescence maximum); F_0 est l'émission de fluorescence lorsque tous les centres réactionnels du PSII sont ouverts (fluorescence minimale); et V_J est la fluorescence relative à la transition J (Strasser *et al.*, 2004).

5.2.6.3 Viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire a été évaluée à l'aide du cytomètre en flux, BD Accuri C6 (Becton, Dickinson & co, Franklin Lakes, É.U.) en utilisant l'iodure de propidium

(solution de stock de 1,0mg/mL, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Allemagne) comme marqueur de mortalité à une concentration de 40µM.

5.2.7 Analyses statistiques

Toutes les expériences ont été réalisées en deux essais en triplicata, excepté pour les bioessais avec les artémies qui sont constituées de trois essais en triplicata. Le test one-way analysis of variance (ANOVA) a été effectué avec le logiciel Origin 2016 Graphing & Analysis. Le test post-hoc employé était le test Tuckey. Les résultats où p était inférieur à 0,05 étaient considérés significatifs.

5.3 Résultats et discussion

5.3.1 Caractérisation physico-chimique des nanoparticules

Les résultats obtenus montrent que les Fe_3O_4 -NPs et les CuO -NPs se comportent de façon similaire selon la salinité. La charge de surface des nanoparticules mesurée par le potentiel Zêta (fig. 5.1 et 5.2) diminue en intensité avec l'augmentation de la force ionique du milieu. Le milieu HSM a une force ionique respectivement de $1,75 \times 10^{-2}$, $1,043 \times 10^{-1}$ et $2,914 \times 10^{-1}$ eq/L pour l'eau douce, une salinité de 10 g/L et de 32 g/L. Dans le milieu Instant Ocean, la force ionique est de $6,908 \times 10^{-3}$ et 7,486 eq/L respectivement pour les salinités de 10 et 32 g/L. Les résultats montrent qu'une plus grande concentration en ions dans le milieu supprime la charge de surface, ce qui entraîne l'agglomération des nanoparticules (fig. 5.3 et 5.4). Le même phénomène a été observé auparavant avec les TiO_2 -NPs en solution aqueuse (Jiang *et al.*, 2009). De plus, les deux NPs forment des agglomérations plus importantes dans le milieu Instant Ocean par rapport au milieu HSM (fig. 5.3 et 5.4). Le diamètre hydrodynamique des Fe_3O_4 -NPs est de 600-800 nm dans le milieu Instant Ocean et de 400-600 nm dans le milieu HSM pour les salinités de 10 et 32 g/L, respectivement.

Par contre, le diamètre hydrodynamique des CuO-NPs est de 200-300 nm dans le milieu Instant Ocean et de 150-250 nm dans le milieu HSM pour les mêmes salinités. Normalement, une force ionique plus importante dans le milieu entraîne une diminution de l'intensité du potentiel Zêta. Même si le milieu Instant Ocean possède la force ionique la plus importante des milieux étudiés à une salinité de 32 g/L, le même milieu à une salinité de 10 g/L possède la force ionique la plus faible. Le diamètre hydrodynamique obtenu pour les deux types de nanoparticules est pourtant semblable pour ces deux salinités dans le milieu Instant Ocean. Par conséquent, une salinité à partir de 10 g/L influence significativement le comportement des nanoparticules en solution causant la formation d'agglomérations plus importantes par rapport au témoin (aucune salinité).

D'après nos résultats, les CuO-NPs ont tendance à former des agglomérats plus petits (150-250 nm) que les Fe₃O₄-NPs (400-600 nm) dans le milieu HSM (fig. 5.4). Habituellement, une charge de surface importante en valeur absolue permet aux nanoparticules d'être plus stables en solution en raison des forces de répulsion électrostatiques. Les particules se repoussent et elles restent ainsi dispersées en solution. Cependant, les potentiels Zêta des Fe₃O₄-NPs et des CuO-NPs sont semblables dans toutes les conditions excepté dans le milieu d'eau douce HSM (fig. 5.2). Ce milieu est le seul qui soit à pH neutre, les autres étant de 8,1. Dans le milieu HSM, les Fe₃O₄-NPs ont une charge d'environ -43,0 (\pm 2,1) mV et les CuO-NPs ont une charge d'environ -59,9 (\pm 2,4) mV. Le point isoélectrique de la magnétite est beaucoup plus bas que celui de l'oxyde de cuivre, soit 6,5 (\pm 0,2) comparativement à 9,5 (\pm 0,4) (Parks, 1965). Le fait que le point isoélectrique des Fe₃O₄-NPs soit proche du pH neutre peut expliquer pourquoi la charge de surface est moins importante que celle des CuO-NPs à ce pH. De plus, la présence de l'EDTA ne diminuerait pas le potentiel Zêta de façon significative (fig. 5.2). Ainsi, l'effet sur le diamètre hydrodynamique n'est pas significatif dans les conditions observées (fig. 5.4).

D'après nos travaux expérimentaux, le dernier paramètre qui favorise la formation d'agglomérats est l'augmentation de la concentration des NPs en solution. Le diamètre hydrodynamique des Fe_3O_4 -NPs est évalué à 600 et 800 nm pour les concentrations de 50 et 100 mg/L, respectivement, dans le milieu Instant Ocean. Pour les CuO-NPs, le diamètre hydrodynamique est de 200-250 et 250 nm pour les concentrations de 50 et 100 mg/L, dans le même milieu. Dans le milieu HSM, le diamètre hydrodynamique des Fe_3O_4 -NPs varie de 300-400 et 400-600 nm pour les concentrations de 50 et 100 mg/L, respectivement (fig. 5.4). Pour les CuO-NPs, des valeurs de 150-200 et 150-250 nm sont observées pour les concentrations de 50 et 100 mg/L, respectivement. La formation d'agglomérats plus importants est expliquée par les interactions particules-particules qui sont plus nombreuses lorsque la solution est plus concentrée. Ce sont ces interactions qui déstabilisent la dispersion (Jiang *et al.*, 2009).

D'après les résultats obtenus, les Fe_3O_4 -NPs possèdent une très faible solubilité ($<0,02$ ppm) et la méthodologie employée n'a pas permis de déterminer leur concentration, sauf dans le HSM à une salinité de 32 g/L où $0,46 (\pm 0,12)$ ppm de fer en solution ont été détecté pour 100mg/L de NPs. Autrement dit, la concentration du fer soluble en milieu salin peut être évaluée comme étant inférieure à la limite de détection de l'appareil soit 0,02 ppm. De plus, nous avons observé que l'EDTA a un effet significatif sur la solubilité des CuO-NPs (fig. 5.5). Une concentration de 100 mg/L d'EDTA augmente la solubilité du cuivre d'un facteur allant jusqu'à 24 fois dans le milieu Instant Ocean et 139 fois dans le milieu HSM. L'EDTA est un puissant chélateur et il est souvent utilisé dans les milieux de culture pour solubiliser les métaux essentiels (Schmidt et Brauch, 2004). La formation d'un complexe entre un métal spécifique et un ligand comme l'EDTA est déterminée par la concentration des autres métaux présents dans le milieu ainsi que par la constante de stabilité du complexe métal-ligand (Nowack, 2002). Le cuivre et le fer font partie des métaux qui possèdent une bonne affinité avec l'EDTA. Les constantes de dissociation du

complexe (pK_c) sont de 18,8 pour Cu^{2+} , 14,3 pour Fe^{2+} et 25,1 pour Fe^{3+} (Tardat-Henry et Beaudry, 1992). Malgré cela, l'EDTA peut être moins efficace pour solubiliser les CuO-NPs dans le milieu Instant Ocean si d'autres métaux ou ions présents en grande concentration entrent en compétition pour se lier à l'EDTA. Cependant, les interactions entre les NPs et l'EDTA sont très peu documentées. Les mécanismes qui pourraient expliquer l'augmentation de la solubilité du cuivre ne sont pas connus. Il est possible qu'en se liant au cuivre des CuO-NPs, l'EDTA entraîne la dégradation de la nanoparticule. L'ion de cuivre resterait donc solubilisé sous forme de complexe ou relâché dans le milieu. La taille hydrodynamique des nanoparticules et leur nature chimique pourraient aussi influencer leur solubilité. La plus faible solubilité des Fe_3O_4 -NPs comparativement au CuO-NPs pourrait être due au fait qu'elles forment des agglomérats beaucoup plus importants. De plus, la structure atomique plus complexe de la magnétite peut faire en sorte que l'EDTA se lie plus difficilement au métal comparativement à un oxyde simple comme l'oxyde de cuivre, car la surface de contact est plus petite.

5.3.2 Bioessais de toxicité

Les résultats indiquent que les Fe_3O_4 -NPs n'ont pas eu d'effet toxique significatif sur la viabilité d'*Artemia sp.* à aucune des deux salinités testées (fig. 5.6). Par contre, les CuO-NPs causent une létalité significative de 5,3 ($\pm 2,7$) (/30 individus) aux concentrations de 50 et 100 mg/L dans le milieu salin de 10g/L (fig. 5.6A). Par contre, l'effet des CuO-NPs en présence d'EDTA et pour une salinité de 32 g/L n'est pas significatif par rapport au témoin. Ces deux paramètres du milieu semblent diminuer la biodisponibilité des NPs. En fait, pour *Artemia sp.*, l'EDTA peut agir par un mécanisme de chélation et une augmentation de la salinité entraîne la formation d'agglomérats plus importants, ce qui favorise la sédimentation des NPs. De plus, il a été remarqué que les Fe_3O_4 -NPs et les CuO-NPs sont bioaccumulés dans les intestins des *Artemia sp.* sans nécessairement entraîner la létalité dans le cadre du test

(fig. 5.7). Ce phénomène a déjà été observé par Ates *et al.* (2013) où les artémies avaient ingéré des particules d'une taille pouvant aller jusqu'à 50 μm . Elles peuvent donc facilement ingérer les NPs sans discrimination de la taille des agglomérats qui avaient des tailles inférieures à 1200 nm dans notre étude.

L'effet toxique des Fe_3O_4 -NPs et les CuO-NPs ont aussi été observés sur la viabilité cellulaire (fig. 5.8), le taux de division cellulaire (fig. 5.9), et l'activité photosynthétique (fig. 5.10) des algues *C. reinhardtii* et *C. euryale*. Les résultats montrent qu'en absence d'EDTA, les CuO-NPs ont tendance à diminuer la viabilité cellulaire de *C. reinhardtii*. Cependant, cet effet n'est pas significatif. Les NPs étudiées ont tendance à stimuler la division cellulaire dans toutes les conditions testées pour les CuO-NPs et aux salinités de 10 et 32 g/L pour les Fe_3O_4 -NPs (fig. 5.9). Le cuivre et le fer soluble sont probablement utilisés comme nutriment par les algues favorisant leur croissance. Pour les Fe_3O_4 -NPs, la stimulation de la croissance n'est significativement différente du contrôle qu'à une salinité de 32 g/L (fig. 5.8C). Ceci concorde avec le fait que les Fe_3O_4 -NPs ne sont solubles qu'à cette même salinité.

Également, la présence des Fe_3O_4 -NPs et des CuO-NPs en solution a tendance à stimuler l'activité photosynthétique dans toutes les conditions testées (fig. 5.10). Dans la littérature, les métaux tels que le cuivre peuvent empêcher la formation d'oxygène moléculaire dans les centres réactionnels de la photosynthèse ou encore inhiber le transport des électrons dans le PSII (Burda *et al.*, 2002). Toutefois, plusieurs métaux sont des constituants de plusieurs protéines et enzymes qui sont essentielles au métabolisme. Le fer est présent dans la ferrédoxine et le cuivre dans la plastocyanine et le cytochrome oxydase qui jouent des rôles essentiels dans la photosynthèse (Barón *et al.*, 1995). Dans la littérature, les concentrations de cuivre auxquelles des effets toxiques étaient remarqués allaient de 1 à 10 ppm (Shioi *et al.*, 1978; Juneau *et al.*, 2002). Dans le présent projet, le cuivre soluble atteint une

concentration maximale de 0,33ppm en absence d'EDTA. Cette concentration semble trop faible pour avoir un effet toxique d'autant plus que les phosphates présents dans le milieu ont la capacité de chélater les métaux (Le Faucher *et al.* 2014; Hiriart-Baer *et al.* 2006). La fraction soluble du cuivre augmente avec la concentration d'EDTA (fig. 5.5). Cependant, l'effet toxique n'est pas observé. Les CuO-NPs tendent même à contrebalancer l'effet toxique de l'EDTA.

Les résultats indiquent que l'EDTA a un effet toxique sur les algues particulièrement en milieu d'eau douce sur *C. reinhardtii* où il semble produire un effet de carence avec une mortalité de 100% à l'intérieur de 48 h pour une concentration de 100 mg/L. Cet effet est observé sur la viabilité cellulaire (fig. 5.8), le taux de division cellulaire (fig. 5.9) et l'activité de photosynthèse (fig. 5.11 et 5.12). La présence de Fe₃O₄-NPs et de CuO-NPs semble contrebalancer cet effet. Les NPs métalliques semblent remplacer les métaux traces essentiels aux algues qui ont été chélatés par l'EDTA. La seule exception est l'inhibition de la croissance par les Fe₃O₄-NPs avec 100 mg/L d'EDTA. Ce phénomène est difficile à expliquer. Le ligand n'augmente pas la solubilité des Fe₃O₄-NPs. Une hypothèse possible est que l'EDTA favorise certaines interactions entre la nanoparticule et la paroi cellulaire de l'algue comme c'est le cas pour certains ligands organiques (Wang *et al.*, 2011). Les Fe₃O₄-NPs ont aussi la capacité de piéger certains métaux (Sánchez *et al.*, 2011). Peut-être que la combinaison entre les NPs et 100 mg/L d'EDTA ont chélaté une plus grande proportion de métaux traces essentiels. L'effet de l'EDTA est beaucoup moins marqué en milieu marin (10 et 32 g/L) sur *C. euryale*. Dans ce milieu, différents ions comme le sodium et le potassium sont présents en plus grande proportion. Il est possible que l'EDTA puisse avoir tendance à former davantage de complexes avec ce métal plutôt qu'un autre en raison d'une plus forte concentration (Nowack, 2002).

5.4 Conclusion

Les paramètres environnementaux ont un effet déterminant sur les caractéristiques physico-chimiques des NPs. Ces caractéristiques déterminent à leur tour la biodisponibilité des NPs et leur effet toxique sur les organismes aquatiques. Les résultats ont démontré que les Fe_3O_4 -NPs et les CuO-NPs ont un effet stimulant sur la croissance et l'activité photosynthétique des algues vertes *C. reinhardtii* et *C. euryale*. Les CuO-NPs (contrairement aux Fe_3O_4 -NPs) ont un effet létal sur le crustacé *Artemia sp.* Ce résultat peut être expliqué par le fait que les CuO-NPs sont plus solubles et forment des agglomérats plus petits que les Fe_3O_4 -NPs. La salinité tend à augmenter la taille des agglomérats des NPs, ce qui entraîne une diminution de leur effet sur *Artemia sp.*, *C. reinhardtii* et *C. euryale*. En somme, les NPs représenteraient un moins grand danger en milieu marin qu'en eau douce. L'EDTA diminue l'effet toxique des CuO-NPs sur *Artemia sp.* Toutefois, le ligand s'est avéré être toxique pour les algues en provoquant un effet de carence. Les effets observés, qu'ils soient inhibant ou stimulant, peuvent s'avérer tout aussi nocif l'un que l'autre et provoquer un déséquilibre dans l'écosystème. Une surveillance de l'EDTA et des NPs pourrait être envisagée.

5.5 Remerciements

Ces travaux ont été financés en partie par le RAQ (Ressources Aquatiques Québec), le CRSNG (Conseil de recherche en sciences naturelles et en génie du Canada), le FRQNT (Fonds de recherche du Québec - Nature et technologies) et la fondation de l'UQAM.

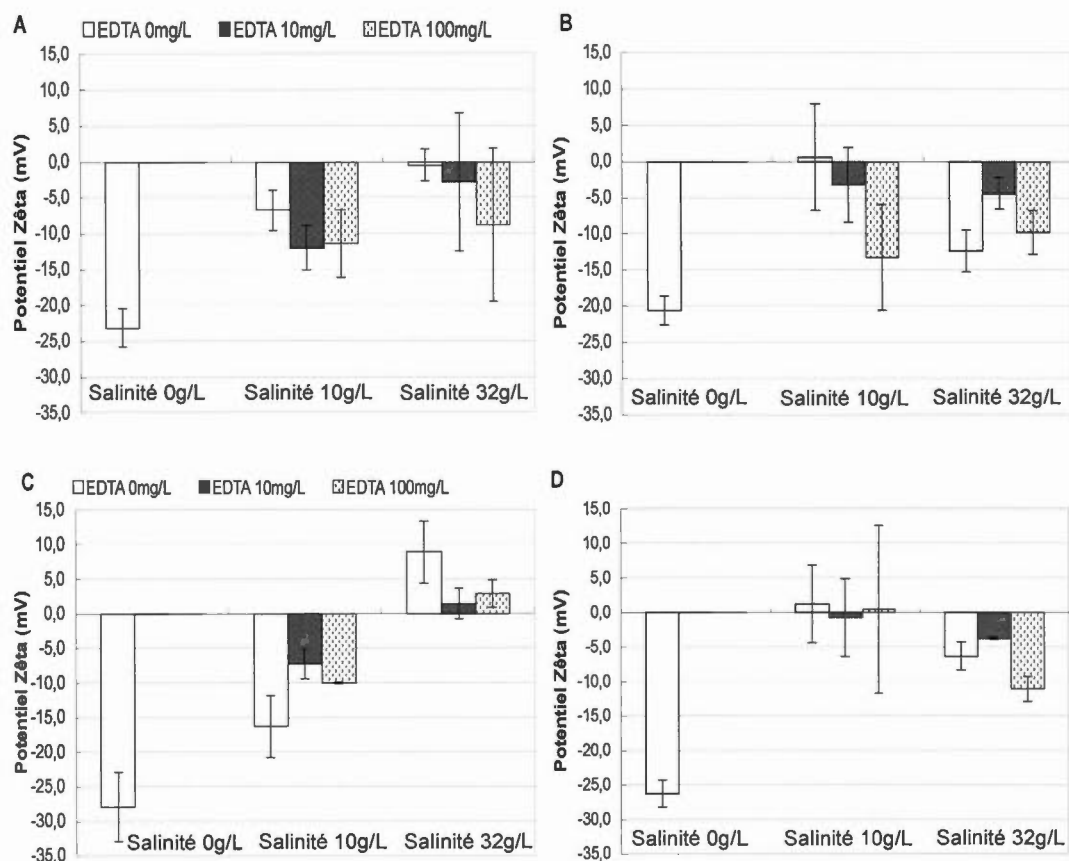


Figure 17. Potentiel Zêta des Fe₃O₄-NPs à 50mg/L (A) et 100mg/L (B) et des CuO-NPs à 50mg/L (C) et 100mg/L (D) dans le milieu Instant Ocean selon la salinité (0, 10 et 32g/L) en présence d'EDTA (0, 10 et 100mg/L) à un pH de 8,1.

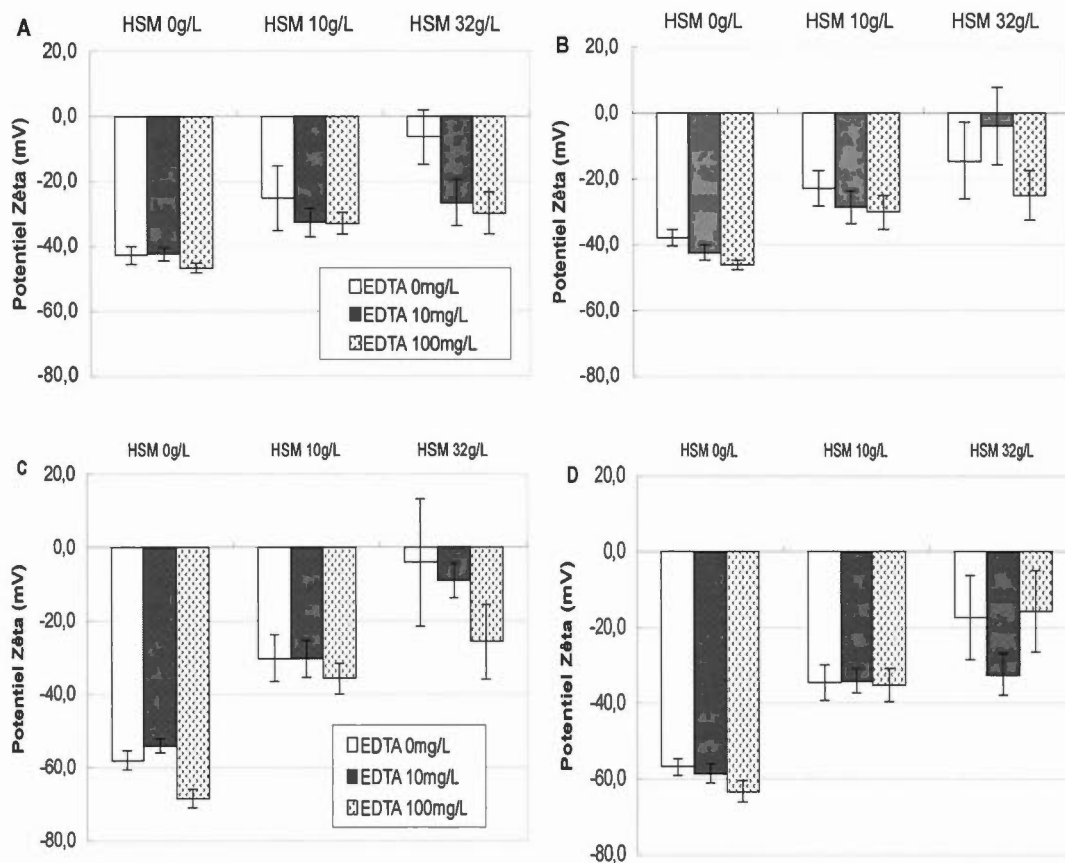


Figure 18. Potentiel Zêta des Fe₃O₄-NPs à 50mg/L (A) et 100mg/L (B) et des CuO-NPs à 50mg/L (C) et 100mg/L (D) exposé à l'EDTA (0, 10 et 100mg/L) dans le milieu HSM pour différentes salinités (0, 10 et 32g/L).

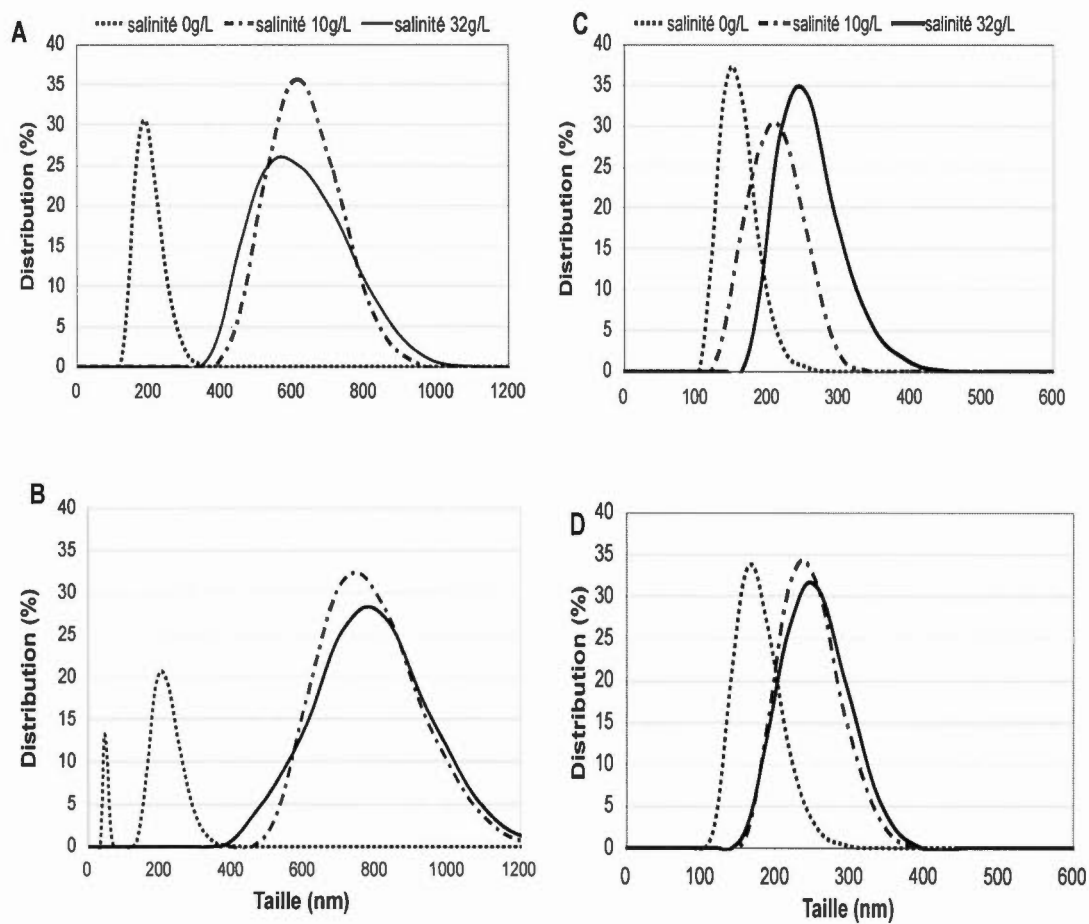


Figure 19. Diamètre hydrodynamique des Fe₃O₄-NPs à 50mg/L(A) et 100mg/L(B) et des CuO-NPs à 50mg/L(C) et 100mg/L(D) dans le milieu Instant Ocean pour différentes salinités (0, 10 et 32g/L).

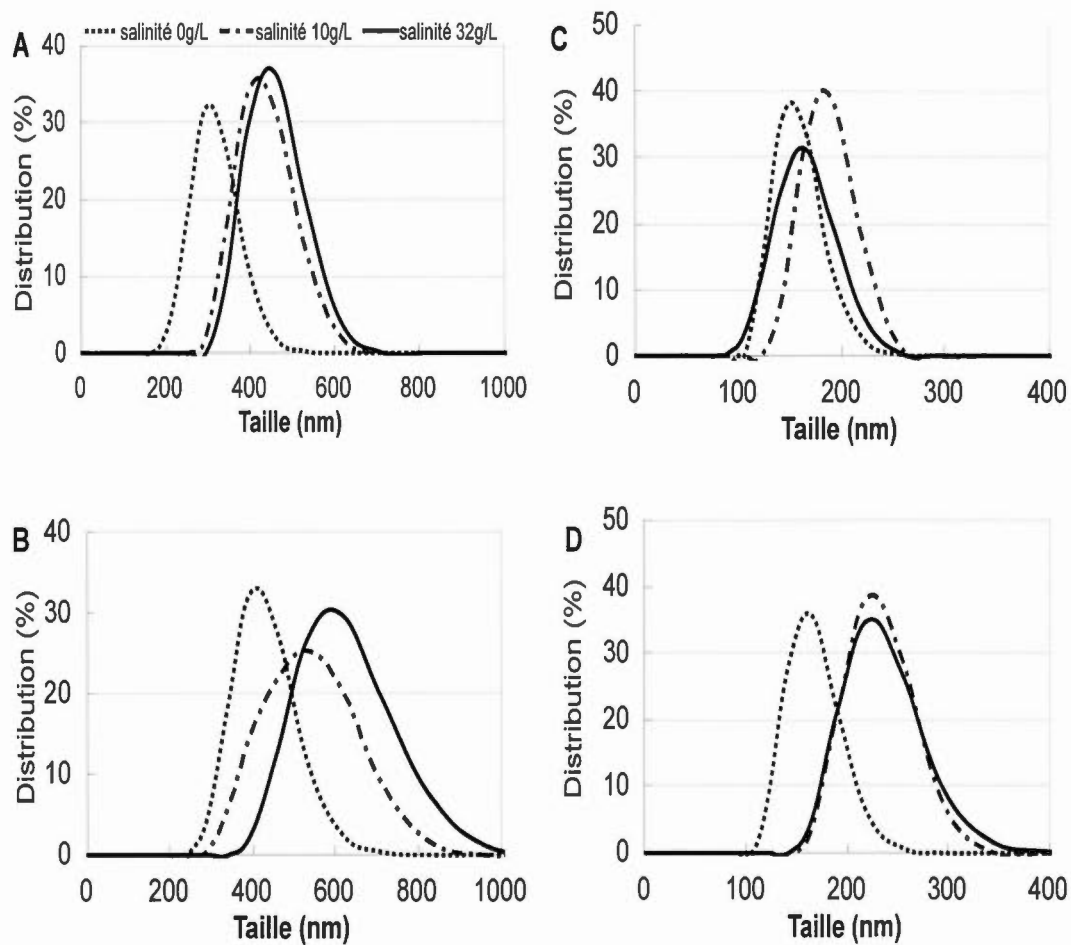


Figure 20. Diamètre hydrodynamique des Fe₃O₄-NPs à 50mg/L(A) et 100mg/L(B) et des CuO-NPs à 50mg/L(C) et 100mg/L(D) dans le milieu HSM pour différentes salinités (0, 10 et 32g/L).

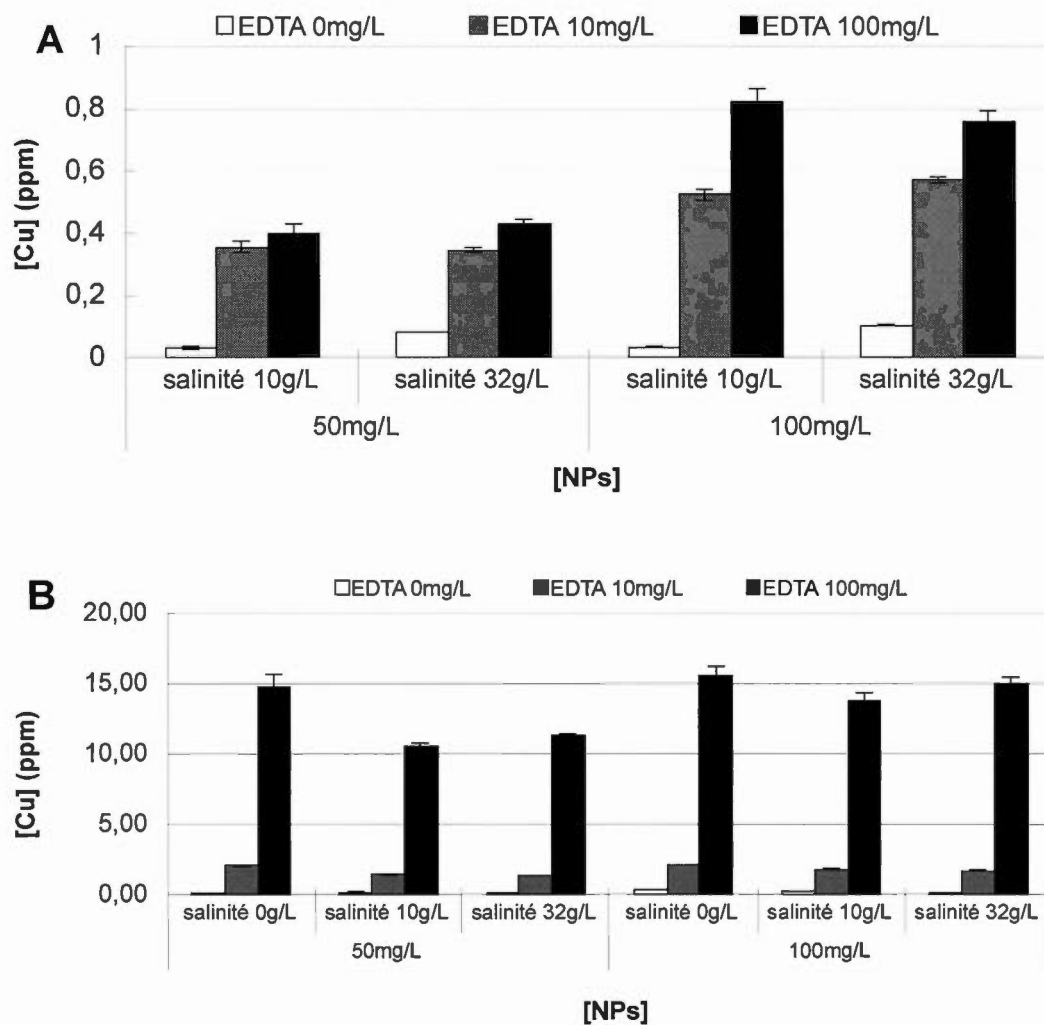


Figure 21. Solubilité des CuO-NPs exposées à l'EDTA (0, 10 et 100mg/L) dans le milieu Instant Ocean (A) et HSM (B) pour différentes salinités (0, 10 et 32g/L).

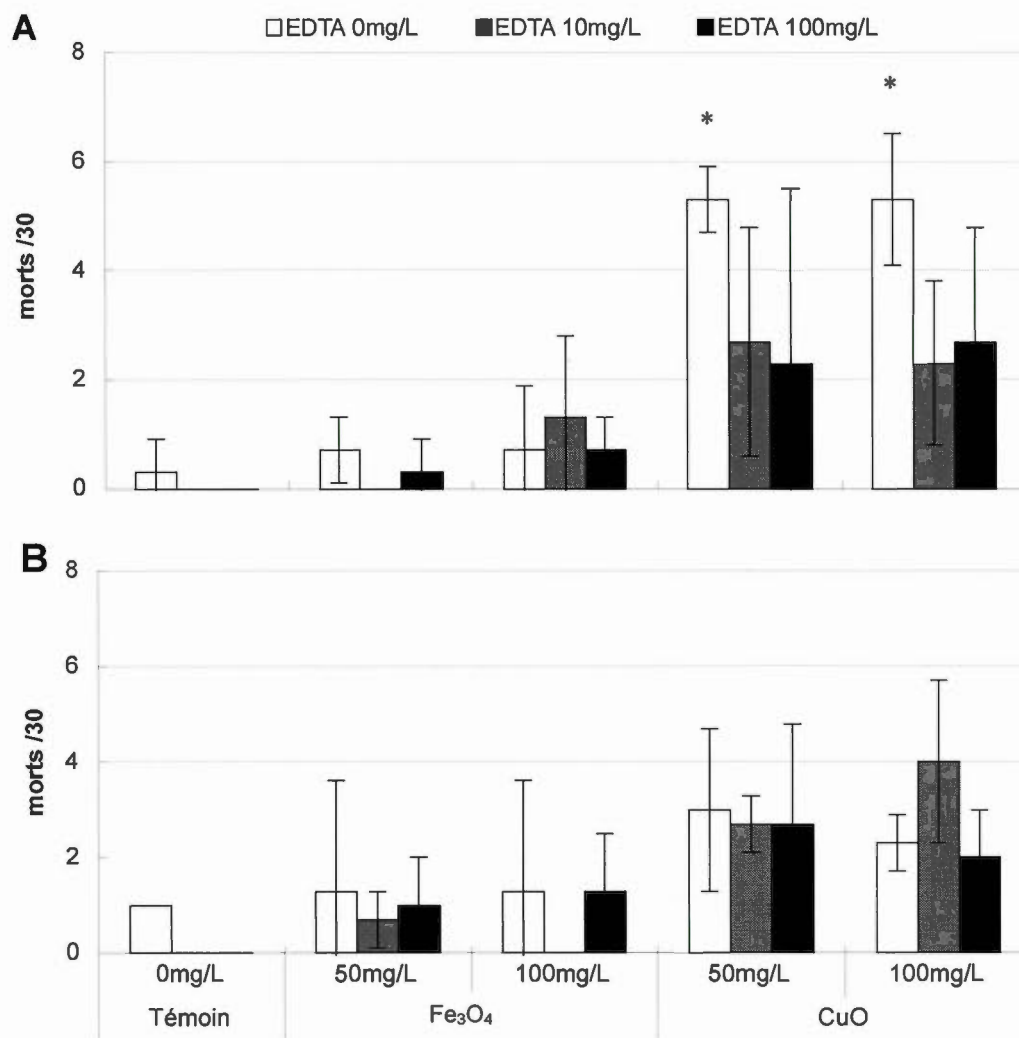


Figure 22. Effet léthal des nanoparticules de Fe₃O₄ et de CuO sur les artémies *nauplii* selon la concentration d'EDTA (0, 10 et 100mg/L) à une salinité de 10g/L (A) et 32g/L (B). Le témoin représente un milieu exempt de NPs et d'EDTA. * représente un résultat significativement différent du témoin ($p < 0,05$).

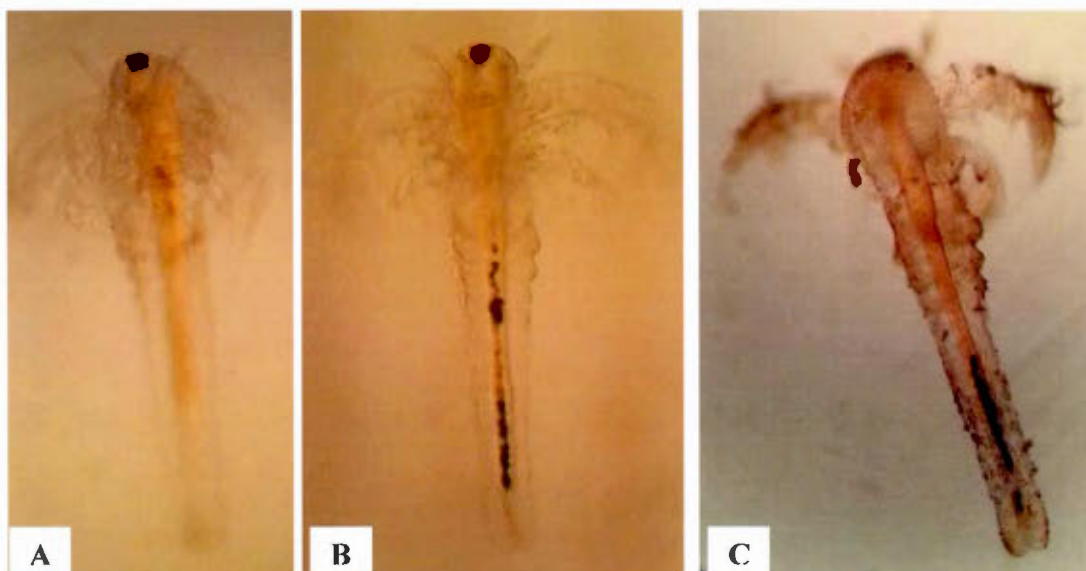


Figure 23. Bioaccumulation des NPs chez *Artemia* sp. après 48h d'exposition. Les photos des artémie *nauplii* ont été prises au microscope optique; Artémie témoin (A), artémie contaminée aux CuO-NPs (B), artémie contaminée aux Fe₃O₄-NPs (C) à des concentrations de 50mg/L.

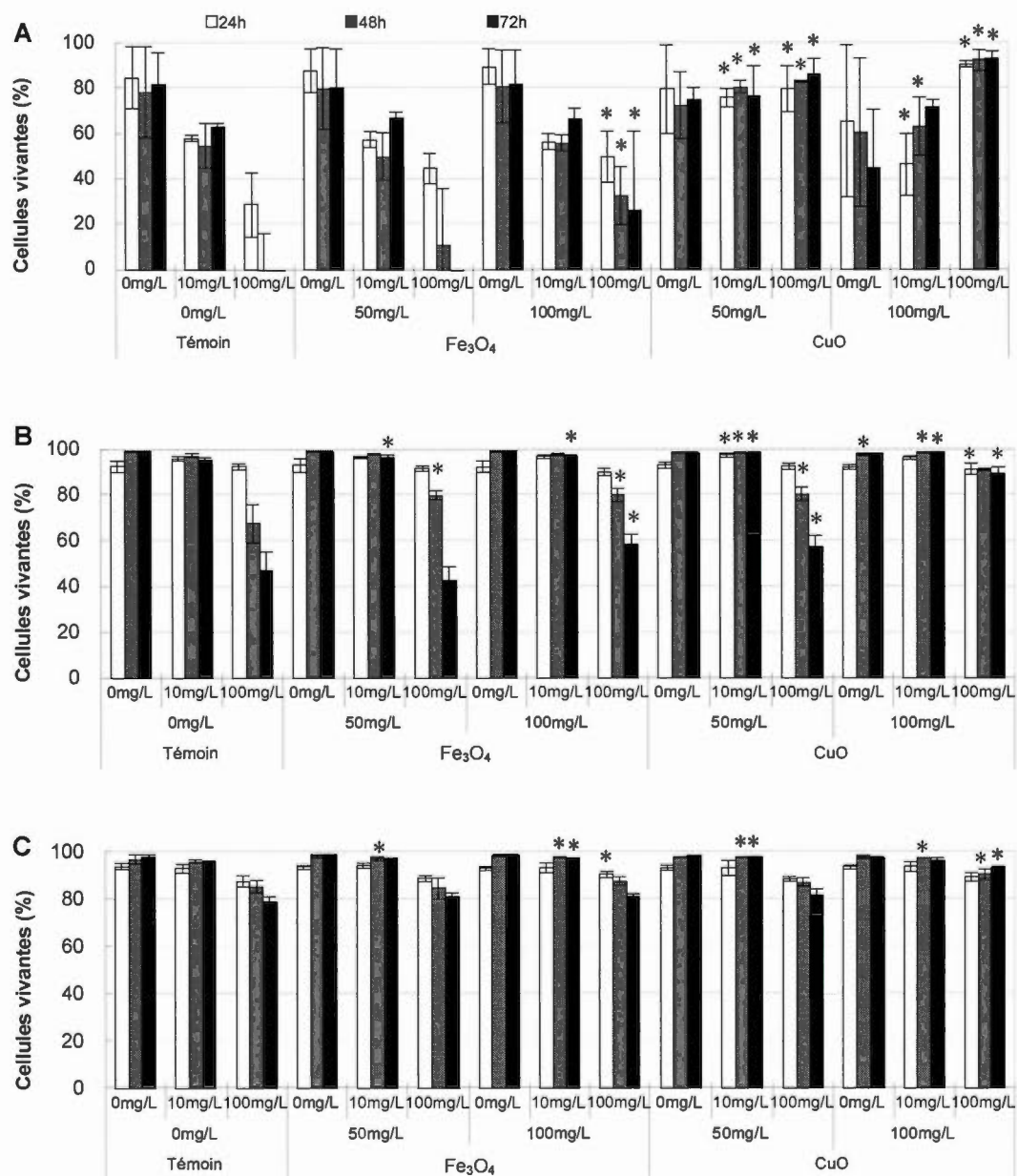


Figure 24. Viabilité cellulaire de *C. reinhardtii* dans le milieu HSM (A) et de *C. euryale* à une salinité de 10g/L (B) et 32g/L (C) selon le temps d'exposition et la concentration d'EDTA (0, 10, 100mg/L). * représente un résultat significativement différent du témoin ($p < 0,05$).

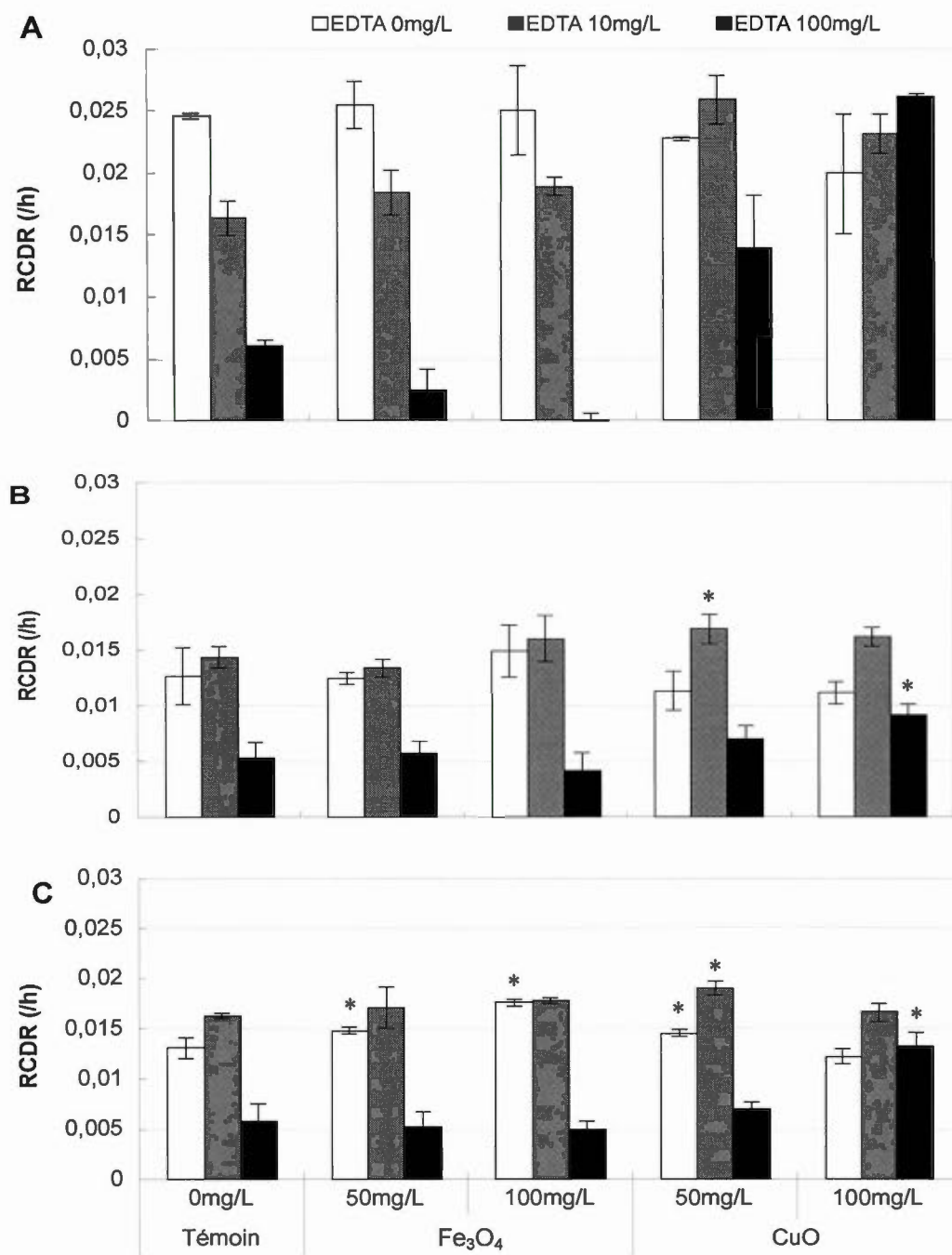


Figure 25. Inhibition de la division cellulaire sur 72h de *C. reinhardtii* dans le milieu HSM (A) et de *C. euryale* dans le milieu HSM à une salinité de 10g/L (B) et 32g/L (C). * représente un résultat significativement différent du témoin ($p < 0,05$).

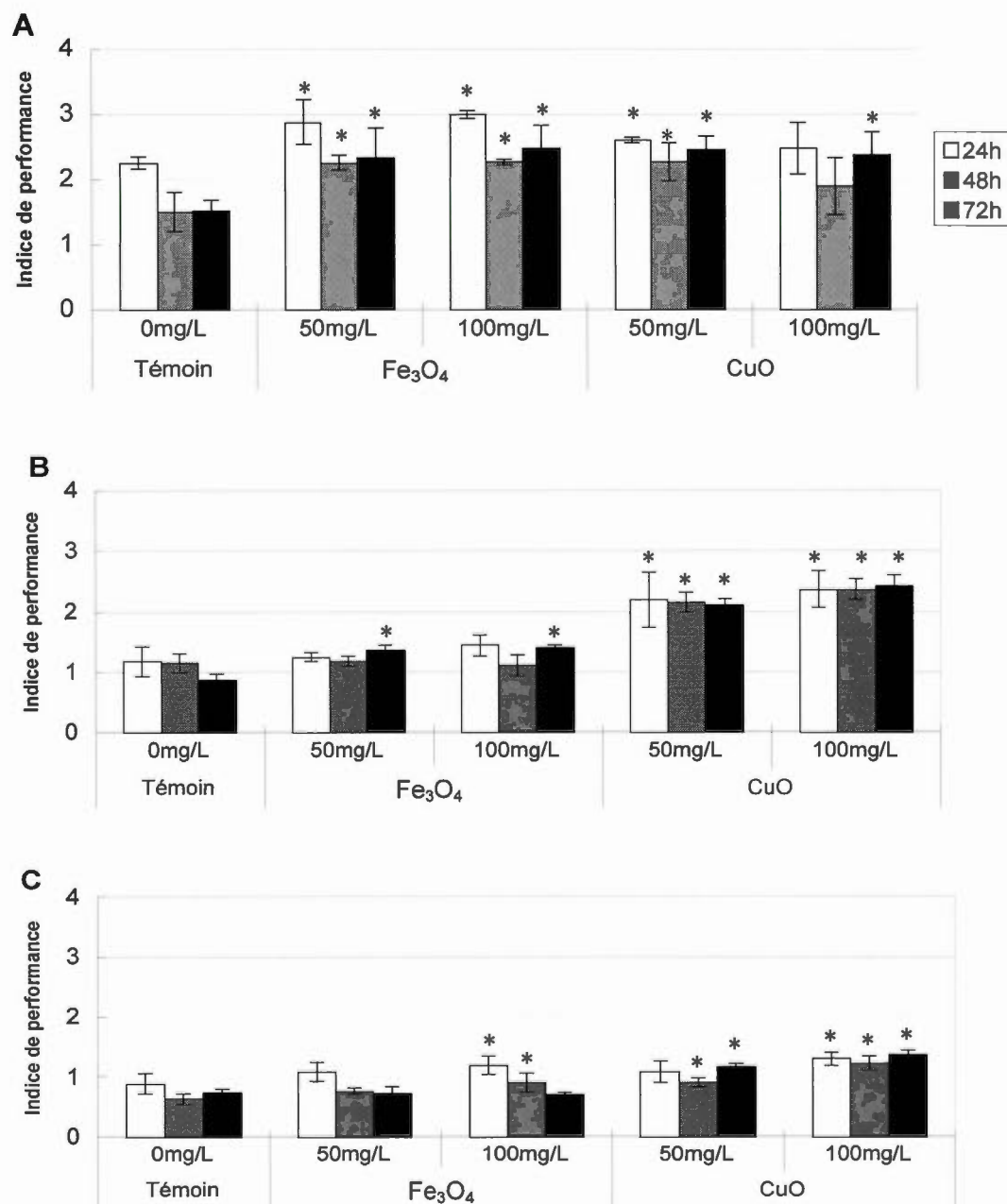


Figure 26. Indice de la performance de l'activité photosynthétique pour *C. reinhardtii* dans le milieu HSM (A) et de *C. euryale* dans le milieu HSM à une salinité de 10g/L (B) et 32g/L (C) selon le temps d'exposition. * représente un résultat significativement différent du témoin ($p < 0,05$).

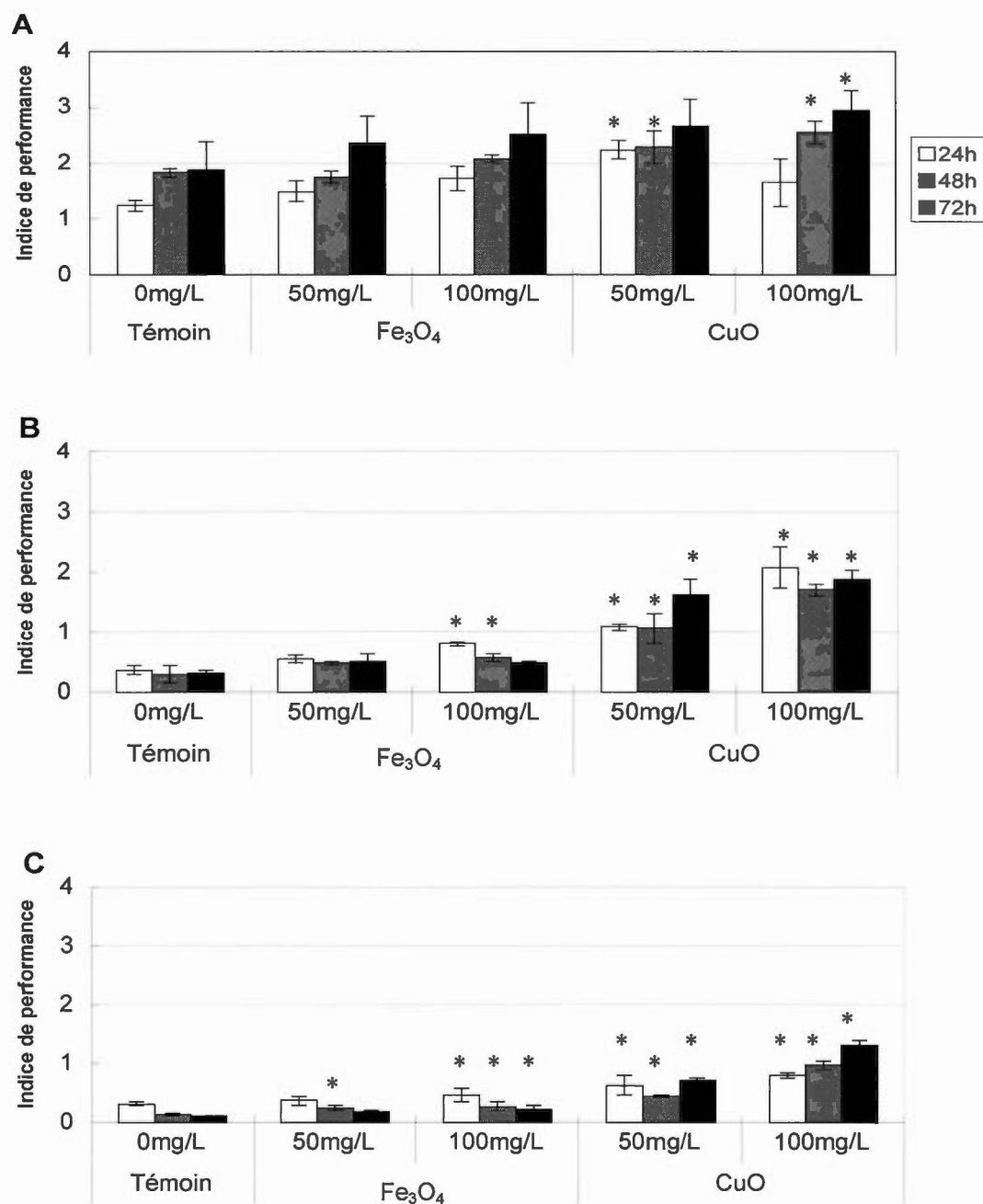


Figure 27. Indice de la performance de l'activité photosynthétique pour *C. reinhardtii* dans le milieu HSM (A) et de *C. euryale* dans le milieu HSM à une salinité de 10g/L (B) et 32g/L (C) selon le temps d'exposition en présence de 10mg/L d'EDTA.

* représente un résultat significativement différent du témoin ($p < 0,05$).

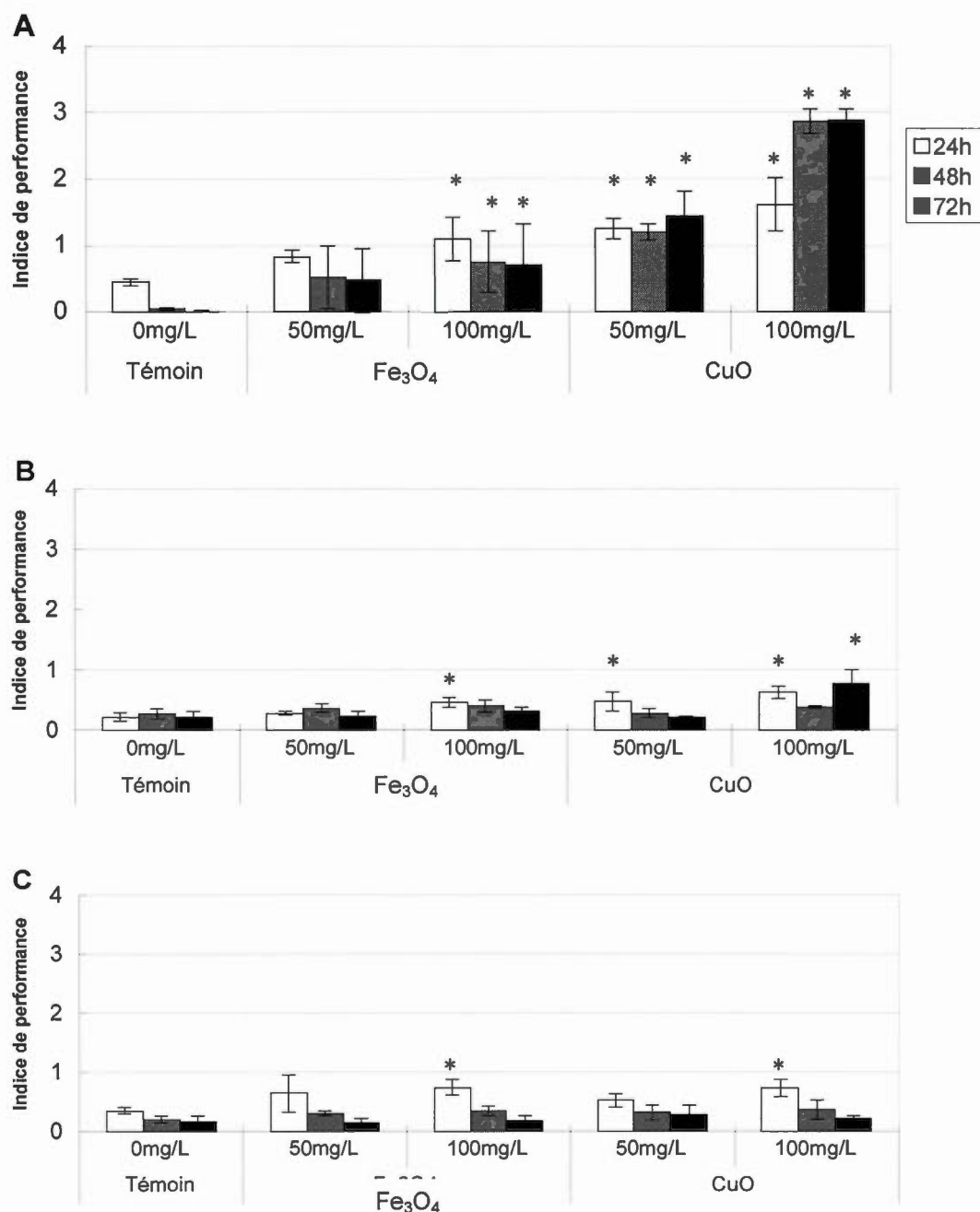


Figure 28. Indice de la performance de l'activité photosynthétique pour *C. reinhardtii* dans le milieu HSM (A) et de *C. euryale* dans le milieu HSM à une salinité de 10g/L (B) et 32g/L (C) selon le temps d'exposition en présence de 100mg/L d'EDTA. * représente un résultat significativement différent du témoin ($p < 0,05$).

CONCLUSION

L'objectif général de ce projet était de déterminer la relation entre les propriétés physico-chimiques et la toxicité des deux NPs: la magnétite (Fe_3O_4 -NPs) et l'oxyde de cuivre (CuO-NPs). Les résultats de ce travail contribuent à l'avancement des connaissances concernant le comportement des nanoparticules en solution aqueuse et à acquérir une meilleure compréhension des interactions entre les paramètres environnementaux et les NPs afin d'ultimement prédire l'effet des NPs sur l'environnement. Les Fe_3O_4 -NPs et les CuO-NPs ont été caractérisées selon leur diamètre hydrodynamique, leur potentiel Zêta et leur solubilité dans différents milieux de culture pour évaluer l'effet de la salinité et de l'EDTA sur leurs propriétés physico-chimiques. Les résultats démontrent que l'EDTA augmente grandement la solubilité des CuO-NPs, mais que cette solubilité n'entraîne pas forcément une augmentation de la biodisponibilité des NPs. L'effet des NPs sur le crustacé *Artemia sp.* et les algues vertes *Chlamydomonas reinhardtii* et *Chlamydomonas euryale* ont été étudiés. Il a été observé que l'EDTA peut provoquer un effet de carence en nutriments chez les organismes vivants tandis que les Fe_3O_4 -NPs et les CuO-NPs en faible concentration (≤ 100 mg/L) peuvent aussi bien produire un effet toxique que favoriser, à court terme, le développement d'organismes aquatiques. En général, les CuO-NPs se sont avérées être plus toxiques que les Fe_3O_4 -NPs. Ce résultat s'accorde avec le fait qu'un diamètre hydrodynamique plus petit rend les NPs plus biodisponibles. Ce projet contribue également à déterminer l'impact que pourraient avoir les NPs dépendamment si elles se trouvent en eaux douces, en eaux saumâtres ou en milieu marin. Les résultats obtenus ont démontré que la salinité tend à augmenter la taille des agglomérats et diminue la biodisponibilité des NPs.

Cette étude montre que les paramètres environnementaux ont un effet déterminant sur les caractéristiques physico-chimiques des NPs. Ces caractéristiques déterminent à leur tour la biodisponibilité des NPs et leur effet toxique sur les organismes aquatiques. Lorsqu'elles sont relâchées dans l'environnement, les NPs peuvent s'ajouter et interagir avec une multitude de composés déjà présents. Ces interactions peuvent créer un déséquilibre dans les milieux naturels ce qui peut nuire aux organismes aquatiques et plus globalement les écosystèmes. Dans cette perspective, cette étude démontre que les nanoparticules de magnétite et d'oxyde de cuivre peuvent représenter un risque pour l'environnement. L'évaluation de ce risque est un processus complexe, mais il est nécessaire : Les nanoparticules doivent être gérées de façon sécuritaire pour assurer une bonne qualité de l'environnement sans nuire au développement des nanotechnologies.

En dernier lieu, les mécanismes de toxicité des nanoparticules n'ont pas été abordés dans ce travail. Par conséquent, la façon dont les nanoparticules se comportent à l'intérieur des cellules demeure nébuleuse. Ainsi, plusieurs aspects comme la dissolution des nanoparticules dans la cellule et leur distribution dans les différentes organelles pourraient faire l'objet d'études approfondies. Ces dernières amèneraient un éclairage nouveau qui permettrait une meilleure compréhension de l'écotoxicologie des nanoparticules.

BIBLIOGRAPHIE

- Adam, N., C. Schmitt et R. Blust. (2015). Aquatic acute species sensitivity distributions of ZnO and CuO nanoparticles. *Science of The Total Environment*, 526, 233-242.
- Adam, N., A. Vakurov et R. Blust. (2015). The chronic toxicity of CuO nanoparticles and copper salt to *Daphnia magna*. *Journal of Hazardous Materials*, 283, 416-422.
- Advanced Chemistry Development Inc. (c1994-2016), *ACD/ChemSketch* (Version C30E41). [Freeware]. Toronto : ACD/Labs.
- Akratopulu, K. C., C. Kordulis et A. Lycourghiotis. (1990). Effect of temperature on the point of zero charge and surface charge of TiO₂. *Faraday Transactions*, 86, 3437-3440.
- Allouni, Z. E., M. R. Cimpan et N. R. Gjerdet. (2009). Agglomeration and sedimentation of TiO₂ nanoparticles in cell culture medium. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 68(1), 83-87.
- Arruda, E. J., Rossi, A. P. L., Andrede Porto, K. R., Arakaki, A. H., Scheidt, G. N. et A. R. Roel. (2011). Evaluation of toxic effects with transition metal ions, EDTA, SBTI and acrylic polymers on *Aedes aegypti* (L., 1762) (Diptera: Culicidae) and *Artemia salina* (Artemidae). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53, 335-341.
- Arsenault, G., Cvetkovic, A. D. et R. Popovic. (1993). Toxic Effects of Copper on *Selenastrum capricornutum* Measured by a Flow Cytometry-Based Method. *Water Quality Research Journal of Canada*, 28(4), 757-765.
- Aruoja, V., H. C. Dubourguier et A. Kahru. (2009). Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Science of the Total Environment*, 407(4), 1461-1468.
- Ates, M., Daniels, J., Arslan, Z., Farah, I. O. et H. F. Rivera. (2013). Comparative evaluation of impact of Zn and ZnO nanoparticles on brine shrimp (*Artemia salina*) larvae: effects of particle size and solubility on toxicity. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 15(1), 225-233.

Ates, M., A. Zikri, et O. F. Ibrahim. (2014). Accumulation and toxicity of CuO and ZnO nanoparticles through waterborne and dietary exposure of Goldfish. *Environmental toxicology*, 24(3), 296-303.

Ates, M., M. A. Dugo et V. Demir. (2014). Effect of Copper Oxide Nanoparticles To sheepshead minnow (*cyprinodon Variefatus*) at different salinities. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 9(1), 369-377.

Atkinson M. et C. Bingman. (1998). Elemental composition of commercial sea salts. *Journal of Aquaculture Aquatic Sciences*, 8, 39–43.

Avramescu, M.-L., P. E., Rasmussen, M., Chénier, H. D., Gardner. (2016). Influence of pH, particle size and crystal form on dissolution behaviour of engineered nanomaterials. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-12.
DOI 10.1007/s11356-016-7932-2

Baek, Y.-W. et Y.-J. An. (2011). Microbial toxicity of metal oxide nanoparticles (CuO, NiO, ZnO, and Sb₂O₃) to *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Streptococcus aureus*. *Science of The Total Environment*, 409(8), 1603-1608.

Barhoumi, L. et D. Dewez. (2013). Toxicity of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles on Green Alga *Chlorella vulgaris*. *BioMed Resaerch International*, 2013, 647974.

Barhoumi, L., A. Oukarroum et D. Dewez. (2015). Effects of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles on Photosynthesis and Growth of the Aquatic Plant *Lemna gibba*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 68(3), 510-520.

Barón, M., Arellano, J. B. et J. L. Gorgé. (1995). Copper and photosystem II; a controversial relationship. *Physiologia Plantarum*, 94, 174-180.

Barrena, R., E. Casals et V. Puentes. (2009). Evaluation of the ecotoxicity of model nanoparticles. *Chemosphere*, 75(7), 850-857.

Bielmyer-Fraser, G. K., T. Jarvis et R. J. Miller. (2014). Cellular Partitioning of Nanoparticulate versus Dissolved Metals in Marine Phytoplankton. *Environmental science & technology*, 48(22), 13443-13450.

Blinova, I., L. Kanarbik et A. Kahru. (2015). Ecotoxicity of nanosized magnetite to crustacean *Daphnia magna* and duckweed *Lemna minor*. *Hydrobiologia*.
DOI 10.1007/s10750-015-2540-6

Brant, J., Lecoanet, H. et R. M. Wiesner. (2005). Aggregation and deposition characteristics of fullerene nanoparticles in aqueous systems. *Journal of Nanoparticle Research*, 7(4-5), 545-553.

Bringmann G, Kühn R. (1980). Comparison of the toxicity thresholds of water pollutants to bacteria, algae, and protozoa in the cell multiplication inhibition test. *Water Research*, 14, 231-241.

Brookhaven Instruments Corporation. (2002) *ZetaPlus: Zeta Potential Analyzer Instruction Manual*. Holtsville, Brookhaven Instruments Corporation.

Brul, S. et P. Coote. (1999). Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*, 50(1-2), 1-17.

Brunsting, A. (1974). Can light-scattering techniques be applied to flow-through cell analysis? *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 22(7), 607-615.

Bunthof, C. J., Van Den Braak, S. D., Breeuwer, P., Rombouts, F. M. et, T., Abee. (1999). Rapid fluorescence assessment of the viability of stressed *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(8), 3681-3689.

Burda, K., Kruk, J., Strzalka, K. et G. H. Schmid. (2002). Stimulation of Oxygen Evolution in Photosystem II by Copper (II) Ions. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*, 57, 853-857.

Canadian Phycological Culture Center. [s.d]. *Modified high salt medium (HSM) aka Sueoka's medium*. Récupéré le 14 novembre 2015 de <https://uwaterloo.ca/canadian-phycological-culture-centre/cultures/culture-media/high-salt-medium>

Chappell, M. A., Miller, L. F., George, A. J., Pettway, B. A., Price, C. L., Porter, B. E., Bednar, A. J., Seiter, J. M., Kennedy, A. J., et J. A. Steevens, (2011). Simultaneous dispersion-dissolution behavior of concentrated silver nanoparticle suspensions in the presence of model organic solutes. *Chemosphere*, 84(8), 1108-1116.

Chen, X., X. Zhu, et X. Yang. (2012). Photosynthetic Toxicity and Oxidative Damage Induced by Nano-Fe₃O₄ on *Chlorella vulgaris* in Aquatic Environment. *Open Journal of Ecology*, 02(01), 21-28.

Chiang, C.-Y., Y. Shin et S. Ehrman. (2014). Dopant Effects on Copper Oxide Photoelectrochemical Cell Water Splitting. *Energy Procedia*, 61, 1799-1802.

Cornic, G. (2007, janvier). *L'émission de fluorescence chlorophyllienne . Régulation de l'activité du PSII et estimation du flux d'électrons dans les thylacoïdes sur des feuilles intactes*. Laboratoire Écologie, Systématique et Évolution (ESE), Université de Paris-Sud.

Dastjerdi, R. et M. Montazer. (2010). A review on the application of inorganic nano-structured materials in the modification of textiles: Focus on anti-microbial properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 79(1), 5-18.

Delosme, R. (1967). Étude de l'induction de la fluorescence des algues vertes et des chloroplastes au début d'une illumination intense, *Biochimica Biophysica Acta*, 143, 108-128.

Dent, R. M., Han, M. et K. K. Niyogi. (2001). Functional genomics of plant photosynthesis in the fast lane using *Chlamydomonas reinhardtii*. *Trends in Plant Science*, 6(8), 364-371.

Departement de planejamento ambiental. (1990). Metodo estatico de determinacao de toxicidade aguda para artemia salina (Leach 1812).

Deonarine, A., Lau, B. L. T., Aiken, G. R., Ryan, J. N. et H. Hsu-Kim. (2011). Effects of Humic Substances on Precipitation and Aggregation of Zinc Sulfide Nanoparticles. *Environmental Science & Technology*, 45, 3217-3223.

Derjaguin, B. et L. Landau. (1941). Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solution of electrolytes. *Acta Physicochim*, 14, 633-662

Dysens, L. N. M. et H. E. Sweers. (1963). Mechanism of two photochemical reactions in algae as studied by means of fluorescence. *Microalgae and Photosynthetic Bacteria*, 353-372.

El-Nahhal, I. M., S. M. Zourab et F. Babonneau. (2012). Nanostructured copper oxide-cotton fibers: synthesis, characterization, and applications. *International Nano Letters*, 2(1), 14-19.

European Chemicals Bureau. (2004). European Union Risk Assessment Report: TETRASODIUM ETHYLENEDIAMINETETRAACETATE (NA₄EDTA).

Evangelou, M. W. H., Ebel, M. et A. Schaeffer. (2007). Chelate assisted phytoextraction of heavy metals from soil. Effect, mechanism, toxicity, and fate of chelating agents. *Chemosphere*, 68(6), 989-1003.

Fish Keeping Advice. [s.d]. *Growing Brine Shrimp for Tropical Fish Food*. Récupéré le 21 décembre 2015 de <http://fishkeepingadvice.com/feeding/>

Gabbay, J. (2006). Copper Oxide Impregnated Textiles with Potent Biocidal Activities. *Journal of Industrial Textiles*, 35(4), 323-335.

Gambardella, C., T. Mesarič, et T. Milivojević. (2014). Effects of selected metal oxide nanoparticles on *Artemia salina* larvae: evaluation of mortality and behavioural and biochemical responses. *Environmental Monitoring and Assessment*, 186(7), 4249-4259.

Gottschalk, F. et B. Nowack. (2011). The release of engineered nanomaterials to the environment. *Journal of Environmental Monitoring*, 13(5), 1145-1155.

Hamm, A. (1996). Komplexbildner in Oberflächengewässern und ihre Bedeutung. *Muench Beitr Abwasser Fisch Flussbiol*, 49, 91– 103.

Handy, R. D., R. Owen et E. Valsami-Jones. (2008). The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. *Ecotoxicology*, 17(5), 315-325.

Hanikenne, M. (2003). *Chlamydomonas reinhardtii* as a eukaryotic photosynthetic model for studies of heavy metal homeostasis and tolerance. *New Phytologist*, 159(2), 331-340.

Hansatech Instruments. [s.d]. *Continuous Excitation Chlorophyll Fluorescence*. Récupéré le 15 novembre 2015 de <http://www.hansatech-instruments.com/products/introduction-to-chlorophyll-fluorescence/continuous-excitation-chlorophyll-fluorescence/>

Harris, E. H. (2001). *Chlamydomonas* as a Model Organism. *Molecular Biology*, 52(1), 363-406.

Harris, D. C. (2010). *Quantitative Chemical Analysis*. (8^e édition). Freeman and Company, New York.

He, Y., J. Wan et T. Tokunaga. (2008). Kinetic stability of hematite nanoparticles: the effect of particle sizes. *Journal of Nanoparticle Research*, 10(2), 321-332.

Hiemenz, P.C. et R. Rajagopalan. (1997). *Principles of Colloid and Surface Chemistry*, 3e édition, Marcel Dekker inc., New York.

- Hiriart-Baer, V. P., Fortin, C., Lee, D. Y., et P. G. C. Campbell. (2006). Toxicity of silver to two freshwater algae, *Chlamydomonas reinhardtii* and *Pseudokirchneriella subcapitata*, grown under continuous culture conditions: Influence of thiosulphate. *Aquatic Toxicology*, 78(2), 136-148.
- Hoshino, A., Fujioka, K., Oku, T., Suga, M., Sasaki, Y. F., Ohta, T., Yasuhara, M., Suzuki, K. et K. Yamamoto. (2004). Physicochemical properties and cellular toxicity of nanocrystal quantum dots depend on their surface modification. *Nano Letters*, 4(11), 2163-2169.
- Hsu-Kim, H. et B. L. T. Lau. (2008). Precipitation and Growth of Zinc Sulfide Nanoparticles in the Presence of Thiol-Containing Natural Organic Ligands. *Environmental Science & Technology*, 42(19), 7236-7241.
- Huang, Y. et A. Keller. (2015). EDTA functionalized magnetic nanoparticle sorbents for cadmium and lead contaminated water treatment. *Water Research*, 80, 159-168.
- Hunter, R.J. (1981). *Zeta Potential in Colloid Science; Principles and Applications*, Academic Press. Great Britain, Oxford.
- Hwang, Y., H. S. Park et W. H. Jung. (2006). Thermal conductivity and lubrication characteristics of nanofluids. *Current Applied Physics*, 6(SUPPL-1), 67-71.
- Isani, G., M. L. Falcioni et G. Falcioni. (2013). Comparative toxicity of CuO nanoparticles and CuSO₄ in rainbow trout. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 97, 40-46.
- Jiang, J., G. Oberdörster, et P. Biswas. (2009). Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *Journal of Nanoparticle Research*, 11(1), 77-89.
- Juneau, P., El Berdey, A. et R. Popovic. (2001). PAM fluorometry in the determination of the sensitivity of *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum*, and *Chlamydomonas reinhardtii* to copper. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 42(2), 155-164.
- Kang, B., S. Han et M. Yang. (2011). One-step fabrication of copper electrode by laser-induced direct local reduction and agglomeration of copper oxide nanoparticle. *Journal of Physical Chemistry C*, 115(48), 23664-23670.
- Keller, A., H. Wang et D. Zhou. (2010). Stability and aggregation of metal oxide nanoparticles in natural aqueous matrices. *Environmental Science and Technology*, 44(6), 1962-1967.

Kennedy, A. J., Chappell, M. A., Bednar, A. J., Ryan, A. C., Laird, J. G., Stanley, J. K. et A. Steevens. (2012). Impact of Organic Carbon on the Stability and Toxicity of Fresh and Stored Silver Nanoparticles. *Environmental Science & Technology*, 46, 10772-10780.

Ko, C. K. et W. G. Lee. (2010). Effects of pH variation in aqueous solutions on dissolution of copper oxide. *Surface, Interface and Analysis*, 42, 1128-1130. DOI 10.1002/sia.3238

Kočanová, I., J. Kuchár, V. Dankovičová et J. Černák. (2010). Redetermination of aqua(dihydrogen ethylenediaminetetraacetato- $\kappa^5\text{O},\text{O}',\text{N},\text{N}',\text{O}''$)nickel(II). *Acta Crystallographica Section E*, 66, m196

Kosmulski, M. (2002). The significance of the difference in the point of zero charge between rutile and anatase. *Advances in Colloid and Interface Science*, 99(3), 255-264.

Krause, G. H. (1988). Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damaging and protective mechanisms. *Physiologia Plantarum*, 74, 566-574.

Lalau, C. M., R. De A. Mohedano et W. G. Matias. (2014). Toxicological effects of copper oxide nanoparticles on the growth rate, photosynthetic pigment content, and cell morphology of the duckweed *Landoltia punctata*. *Protoplasma*, 252(1), 221-229.

Le Faucheur, S., Campbell, P. G. C., Fortin, C. et V. I. Slaveykova. (2014). Interactions between mercury and phytoplankton: Speciation, bioavailability, and internal handling. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(6), 1211-1224.

Lewin, R. A. (1957). Four new species of *Chlamydomonas*. *Canadian Journal of Botany*, 35, 321-326.

Lichtenhaler, H. K. et U. Rinderle. (1988). The Role of Chlorophyll Fluorescence in The Detection of Stress Conditions in Plants. *Analytical Chemistry*, 16(suppl), s29-s85.

Liu, D.-S., Y. Sui, C.-H. Li, W.-T. Cheng, T.-W. Wang et X.-Z. You. (2011). Synthesis, structure and magnetic properties of a two-dimensional manganese(II) complex with a maximum denticity of ethylenediaminetetraacetic ligand. *Inorganica Chimica Acta*, 376, 112-117.

Ma, M., W. Zhu et Z. Wang. (2003). Accumulation, assimilation and growth inhibition of copper on freshwater alga (*Scenedesmus subspicatus* 86.81 SAG) in the presence of EDTA and fulvic acid. *Aquatic Toxicology*, 63(3), 221-228.

Malvern Instruments Ltd. (2004). *Zetasizer Nano Series User Manual*. Worcestershire, Malvern.

Manfra, L., Savorelli, F., Pisapia, M., Magaletti, E. et A. M. Cicero. (2012) Long-term Lethal Toxicity Test with the Crustacean *Artemia franciscana*. *Journal of Visualized Experiments*, 35(62), 5-9

Matranga, V. et I. Corsi. (2012). Toxic effects of engineered nanoparticles in the marine environment: model organisms and molecular approaches. *Marine environmental research*, 76, 32-40.

McDonald, K. J., K. J., Reddy et S. Mukherjee. (2014). Removal of arsenic from groundwater in West Bengal, India using CuO nanoparticle adsorbent. *Environmental Earth Sciences*, 73(7), 3593-3601.

Meißner, T. et K. Oelschlägel et A. Potthoff. (2014). Implications of the stability behavior of zinc oxide nanoparticles for toxicological studies. *International Nano Letters*, 4(3), 116-129.

Meier, R. et F. W. Heinemann. (2002). Structures of the spontaneously resolved six-coordinate potassium chloro-(ethylenediaminetriacetato acetic acid) iron(III) monohydrate and the seven-coordinate potassium (ethylenediaminetetracetato) iron(III) sesquihydrate. *Inorganica Chimica Acta*, 337, 317-327.

Melegari, S. P., F. Perreault et W. G. Matias. (2013). Evaluation of toxicity and oxidative stress induced by copper oxide nanoparticles in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquatic toxicology*, 142-143, 431-440.

Meng, P., Pei, H., Hu, W., Liu, Z., Li, X. et H. Xu. (2015). Allelopathic effects of *Ailanthus altissima* extracts on *Microcystis aeruginosa* growth, physiological changes and microcystins release. *Chemosphere*, 141, 219-226.

Miao, L., C. Wang, et J. Hou. (2015). Effects of pH and natural organic matter (NOM) on the adsorptive removal of CuO nanoparticles by periphyton. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(10), 7696-7704.

Mohd O. F., H. Abdul Aziz et S. Stoll. (2014). Aggregation and disaggregation of ZnO nanoparticles: influence of pH and adsorption of Suwannee River humic acid. *The Science of the total environment*, 468-469, 195-201.

- Moyo, F. et R. Tandlich. (2014). *Daphnia pulex* toxicity testing of ethylenediaminetetraacetic acid tetrasodium salt dihydrate and the wastewater effluent from extraction of rhodium using emulsion liquid membranes. *International Journal of Environmental Research*, 8(4), 1019-1026.
- Mueller, N. C. et B. Nowack. (2008). Exposure modelling of engineered nanoparticles in the environment. *Environmental science & technology*, 42(7), 4447-4453.
- Muller, E. B., S. Lin, et R. M. Nisbet. (2015). Quantitative Adverse Outcome Pathway Analysis of Hatching in Zebrafish with CuO Nanoparticles. *Environmental Science & Technology*, 49, 11817-11824.
- Munday, J. C. et Govindjee. (1969). Light-Induced Changes in the Fluorescence Yield of Chlorophyll *a* In Vivo: III. The Dip and the Peak in the Fluorescence Transient of *Chlorella pyrenoidosa*. *Biophysical Journal*, 9(1), 1-21.
- Murdock, R. C., Braydich-Stolle, L., Schrand, A. M., Schlager, J. J. et S. M. Hussain. (2008). Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique. *Toxicological Sciences*, 101(2), 239-253.
- Navarro, E., A. Baun et R. Behra. (2008). Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology*, 17, 372-386.
- Nowack, B. (2002). Critical Review Environmental Chemistry of Aminopolycarboxylate Chelating Agents. *Environmental Science & Technology*, vol. 36, no 19, p. 4009-4016.
- Oberdörster, G., Maynard, A., Donaldson, K., Castranova, V., Fitzpatrick, J., Ausman, K., Carter, J., Karn, B., Kreyling, W., Lai, D., Olin, S., Monteiro-Riviere, N., Warheit, D., et Y. Hong. (2005). Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy, *Particle and Fibre Toxicology*, 2(8), 1-35.
- Odzak, N., D. Kistler, R. Behra et L. Sigg. (2014). Dissolution of metal and metal oxide nanoparticles in aqueous media. *Environmental Pollution*, 191, 132-138.
- Ort, D. R. et J. Whitmarsh. (2001). Photosynthesis. *Encyclopedia of life Sciences*, 1-7.

- Oukarroum, A., Samadani, M. et D. Dewez. (2014). Influence of pH on the toxicity of silver nanoparticles in the green alga *Chlamydomonas acidophila*. *Water, Air, and Soil Pollution*, 225, 2038-2046.
- Oviedo, C. et J. Rodríguez. (2003). EDTA: The chelating agent under environmental scrutiny, *Quimica Nova*, 26(6), 901-905
- Pankhurst, Q. a., N. T. K. Thanh et S. K. Jones. (2009). Progress in applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 42(22), 224001.
- Panneerselvam, P., N. Morad et K. A. Tan. (2011). Magnetic nanoparticle (Fe_3O_4) impregnated onto tea waste for the removal of nickel(II) from aqueous solution. *Journal of Hazardous Materials*, 186(1), 160-168.
- Parks, G. A. (1965). The isoelectric points of solid oxides, solid hydroxides and aqueous hydroxo complex systems. *Chemical Reviews*, 65 (2), 177-198
DOI: 10.1021/cr60234a002
- Pauluhn, J. (2012). Subchronic inhalation toxicity of iron oxide (magnetite, Fe_3O_4) in rats: Pulmonary toxicity is determined by the particle kinetics typical of poorly soluble particles. *Journal of Applied Toxicology*, 32(7), 488-504.
- Pavlin, M. et V. B.regar. (2012). Stability of nanoparticle suspensions in different biologically relevant media. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 7(4), 1389-1400.
- Pecora, R. (1985). *Dynamic light scattering — applications of photon correlation spectroscopy*, Plenum Press, New York and London.
- Pecora, R. (2000). Dynamic light scattering measurement of nanometer particles in liquids. *Journal of Nanoparticle Research*, 2, 123-131
- Perreault, F., A. Oukarroum et R. Popovic. (2012). Polymer coating of copper oxide nanoparticles increases nanoparticles uptake and toxicity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Chemosphere*, 87(11), 1388-1394.
- Perreault, F., R. Popovic et D. Dewez. (2014). Different toxicity mechanisms between bare and polymer-coated copper oxide nanoparticles in *Lemna gibba*. *Environmental Pollution*, 185, 219-227.
- Persoone, G., M. Van de Vel et B. De Nayer. (1989). Predictive value of laboratory tests with aquatic invertebrates. *Aquatic Toxicology*, 14, 149-166.

Pradhan, A., S. Seena et F. Cássio. (2012). Copper oxide nanoparticles can induce toxicity to the freshwater shredder *Allogamus ligonifer*. *Chemosphere*, 89(9), 1142-1150

Powers, K. W., Palazuelos, M., Moudgil, B. M. et S. M. Roberts. (2007). Characterization of the size, shape, and state of dispersion of nanoparticles for toxicological studies. *Nanotoxicology*, 1(1), 42-51.

Raheb, J., M. E. Kafayati et H. Bardania. (2013). The effect of magnetic Fe₃O₄ nanoparticles on the growth of genetically manipulated bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* (PTSOX4). *Iranian Journal of Biotechnology*, 11, 41-46.

Revia, R. A. et M. Zhang. (2015). Magnetite nanoparticles for cancer diagnosis, treatment, and treatment monitoring: recent advances. *Materials Today*, 19(3), 157-168.
DOI:10.1016/j.mattod.2015.08.022

Rossetto, A. L., S. P. Melegari et W. G. Matias. (2014). Comparative evaluation of acute and chronic toxicities of CuO nanoparticles and bulk using *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*. *Science of the Total Environment*, 490, 807-814.

Rossetto, A. L., D. S. Vicentini et W. G. Matias. (2014). Synthesis, characterization and toxicological evaluation of a core-shell copper oxide/polyaniline nanocomposite. *Chemosphere*, 108, 1057-1114.

Rubinelli, P., Siripornadulsil, S., Gao-Rubinelli, F., et R. T. Sayre. (2002). Cadmium- and iron-stress-inducible gene expression in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: Evidence for H43 protein function in iron assimilation. *Planta*, 215(1), 1-13.

Sánchez, A., S. Recillas et X. Font. (2011). Ecotoxicity of, and remediation with, engineered inorganic nanoparticles in the environment. *Trends in Analytical Chemistry*, 30(3), 5037-516.

Schiavo, S., Oliviero, M., Miglietta, M., Rametta, G. et S. Manzo. (2016). Genotoxic and cytotoxic effects of ZnO nanoparticles for *Dunaliella tertiolecta* and comparison with SiO₂ and TiO₂ effects at population growth inhibition levels. *Science of the Total Environment*, 550, 619-627.

Schmidt, C. K. et H. J. Brauch. (2004). Impact of aminopolycarboxylates on aquatic organisms and eutrophication: Overview of available data. *Environmental Toxicology*, 19(6), 620-637.

Schwertmann U. (1991). Solubility and dissolution of iron oxide. *Plant and Soil*, 130(1), 1-25.

DOI:10.1007/BF00011851

Shang, E., Y. Li et H. Liu. (2015). Effect of aqueous media on the copper-ion-mediated phototoxicity of CuO nanoparticles toward green fluorescent protein-expressing *Escherichia coli*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 122, 238-244.

Shi, J., B. Xu et X. Sun. (2013). Light induced toxicity reduction of silver nanoparticles to *Tetrahymena Pyriformis*: Effect of particle size. *Aquatic Toxicology*, 132-133, 53-60.

Shioi, Y., Tamai, H. et T. Sasa, (1978). Inhibition of photosystem II in the green alga *Scenedesmus obliquus* by nickel. *Physiologia Plantarum*, 44, 434-438.

Skoog, D. A., F. J. Holler et S. R. Crouch. (2007). *Principles of Instrumental Analysis*. (6^e édition). : Belmont, Thomson Brooks/Cole.

Soenen, S. J. H., U. Himmelreich et N. Nuytten. (2010). Intracellular nanoparticle coating stability determines nanoparticle diagnostics efficacy and cell functionality. *Small*, 6(19), 2136-2145.

Sorgeloos, P., C. Remiche-Van et G. Persoone. (1978). Use of *Artemia Nauplii* for toxicity tests - a critical analysis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2, 249-255.

Stirbet, A. D. et R. J. Strasser. (2001). The possible role of pheophytin in the fast fluorescence rise OKJIP. In: PS2001 Proceedings: 12th International Congress on Photosynthesis, S11-027.

Stirbet A. et Govindjee. (2011). On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll *a* fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 104, 236-257.

Strasser, R. J., A. Srivastava et Govindjee. (1995). Polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photobiochemistry and Photobiophysics*, 61, 32-42.

Strasser, R. J., Tsimilli-Michael, M. et A. Srivastava. (2004). *Chlorophyll a Fluorescence: Chapitre 12; Analysis of the Chlorophyll a Fluorescence Transient*, Springer Netherlands.

Straub, J. O., Gysel, D., Kastl, U., Klemmer, J., Sonderegger, M. et M. Studer. (2012). Environmental risk assessment for ancillary substances in biotechnological production of pharmaceuticals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(3), 681-687.

Tang, W. W., G. M. Zeng, et J. L. Gong. (2014). Impact of humic/fulvic acid on the removal of heavy metals from aqueous solutions using nanomaterials: A review. *Science of the Total Environment*, 468-469, 1014-1027.

Tardat-Henry, M. et J.-P. Beaudry. (1992). *Chimie des eaux* (2^e édition). Le Griffon d'Argile, Sainte-Foy.

ThermoFisher Scientific inc. (2016). *Propidium Iodide - 1.0 mg/mL Solution in Water*. Récupéré le 20 décembre 2015 de <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/P3566>

United States Environmental Protection Agency (EPA). (2012). Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. (5e édition). Washington.

Vance, M. E., T. Kuiken et E. P. Vejerano. (2015). Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 6, 1769-1780.

Vanhaecke, P., Tackaert, W. et Sorgeloos, P. (1987). *Artemia Research and its Applications*. Wetteren : Universa Press.

Verwey, E. J. W. et J. T. G. Overbeek. (1941). *Theory of the stability of lyophobic colloids*. Elsevier Publishing Company inc. Netherlands.

Wang, H., R. M. Burgess, et M. G. Cantwell. (2014). Stability and aggregation of silver and titanium dioxide nanoparticles in seawater: Role of salinity and dissolved organic carbon. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(5), 1023-1029.

Wang, L.-F., N. Habibul et D.-Q. He. (2015). Copper release from copper nanoparticles in the presence of natural organic matter. *Water Research*, 68, 12-23.

Wang, Z., J. Li et J. Zhao. (2011). Toxicity and internalization of CuO nanoparticles to prokaryotic alga *microcystis aeruginosa* as affected by dissolved organic matter. *Environmental Science & Technology*, 45(14), 6532-6540.

Ward, T. J., Rausina, G. A., Stonebraker, P. M. et W. E. Robinson. (2002). Apparent toxicity resulting from the sequestering of nutrient trace metals during standard *Selenastrum capricornutum* toxicity tests. *Aquatic Toxicology*, 60(1-2), 1-16.

Wei, Y. Y., Zheng, Q., Liu, Z. P. et Z. M. Yang. (2011). Regulation of tolerance of *chlamydomonas reinhardtii* to heavy metal toxicity by heme oxygenase-1 and carbon monoxide. *Plant and Cell Physiology*, 52(9), 1665-1675.

Weir, A., P. Westerhoff et L. Fabricius. (2012). Titanium Dioxide Nanoparticles in Food and Personal Care Products. *Environmental Science & Technology*, 46(4), 2242-2250.

Williams, S. C., Hong, Y., Danavall, D. C A, Howard-Jones, M. H., Gibson, D., Frischer, M. E. et P.G. Verity. (1998). Distinguishing between living and nonliving bacteria: Evaluation of the vital stain propidium iodide and its combined use with molecular probes in aquatic samples. *Journal of Microbiological Methods*, 32(3), 225-236.

Yeh, C.-J. G., Hsi, B.-L. et W. P. Faulk. (1981). Propidium iodide as a nuclear marker in immunofluorescence. II. Use with cellular identification and viability studies. *Journal of Immunological Methods*, 43(3), 269-275.

Zhao, H.-Z., L. Guang-hua et J. Shao-ge. (2012). Toxicity of Nanoscale CuO and ZnO to *Daphnia magna*. *Chemical research in Chinese Universities*, 28(2), 209-213.

Zhou, D., S. W. Bennett, et A. A. Keller. (2012). Increased Mobility of Metal Oxide Nanoparticles Due to Photo and Thermal Induced Disagglomeration. *PLoS ONE*, 7(5), e37363.